

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>M/40241-PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/ 07253</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/07/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/07/1999</b>
Anmelder  <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07253

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/70 C12N1/21 C12P17/10  
C12P17/16 C12P7/04 C12P7/22 C12P7/02 //(C12N1/21,  
C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MUNRO ANDREW W ET AL: "Regional saturation mutagenesis as an approach to identification of substrate specificity determinants in cytochrome P450 BM3." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 21, Nr. 4, 1993, Seite 409S XP000971665 Biochemical Society 647th Meeting on Chromosomal Abnormalities in Cancer Cells: Identification of Molecules Important for Tumour Development; Sheffield, England, UK; July 20-23, 1993 ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument --- -/--	1,2, 6-12, 15-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07253

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 195 07 546 A (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA) 12. September 1996 (1996-09-12)  das ganze Dokument ---	1,2, 6-12, 15-18
X	GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC) 8. Mai 1996 (1996-05-08)  das ganze Dokument ---	1,2, 6-12, 15-18
X	GB 2 306 485 A (BRITISH GAS PLC) 7. Mai 1997 (1997-05-07)  das ganze Dokument ---	1,2, 6-12, 15-18
X	GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 2, 1997, Seiten 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ---	1-10
X	ENGLAND P A: "The oxidation of naphtalene and pyrene by cytochrome P450cam" FEBS LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 424, Nr. 3, 13. März 1998 (1998-03-13), Seiten 271-274, XP002131695 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument ---	1,2,6-12
P,X	JONES ET AL: "The oxidation of polychlorinated benzenes by genetically engineered cytochrome P450cam: potential applications in bioremediation" CHEMICAL COMMUNICATIONS,ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY,GB, Nr. 3, 7. Februar 2000 (2000-02-07), Seiten 247-248, XP002152716 ISSN: 1359-7345 das ganze Dokument ---	1,2,6-12
P,X	WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK () 2. Juni 2000 (2000-06-02) das ganze Dokument ---	1-3, 6-12, 15-18
	--- -/--	



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 00 09682 A (DAVIS CHRISTOPHER ;MAXYGEN INC (US); AFFHOLTER JOSEPH A (US); SELI) 24. Februar 2000 (2000-02-24) Seite 17, Zeile 11 - Zeile 24; Abbildungen 1-5 Seite 37, Zeile 23 -Seite 38, Zeile 21; Ansprüche 1-141 ---	1,2, 6-12, 15-18
P, X	LI Q S ET AL: "Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst." CHEMISTRY, (2000 MAY 2) 6 (9) 1531-6. , XP000971670 das ganze Dokument ---	1-19
P, X	GILLAM ELIZABETH M J ET AL: "Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 265, Nr. 2, 19. November 1999 (1999-11-19), Seiten 469-472, XP002156034 ISSN: 0006-291X das ganze Dokument ---	1,2,6-19
A	US 5 834 297 A (KIM IN CHEOL ET AL) 10. November 1998 (1998-11-10) das ganze Dokument ---	
A	CHERRY JOEL R ET AL: "Directed evolution of a fungal peroxidase." NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 379-384, XP002156029 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	SCHWANEBERG ULRICH ET AL: "A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 2, 1. Mai 1999 (1999-05-01), Seiten 359-366, XP002156030 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument ---	
	--- -/--	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07253

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>OLIVER CATHERINE F ET AL: "Engineering the substrate specificity of Bacillus megaterium cytochrome P-450 BM3: Hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds."  BIOCHEMICAL JOURNAL,  Bd. 327, Nr. 2, 1997, Seiten 537-544,  XP002156031  ISSN: 0264-6021  das ganze Dokument</p>	
A	<p>ATKINS W M ET AL: "Molecular recognition in cytochrome P-450: alteration of regioselective alkane hydroxylation via protein engineering"  JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY,  WASHINGTON, DC, US,  Bd. 111, 1989, Seiten 2715-2717,  XP002131692  ISSN: 0002-7863</p>	
A	<p>SIBBESEN O ET AL: "Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein"  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD,  Bd. 271, Nr. 37,  13. September 1996 (1996-09-13), Seiten 22462-22469, XP002131693  ISSN: 0021-9258  das ganze Dokument</p>	

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07253

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19507546 A	12-09-1996	WO 9627678 A	12-09-1996
GB 2294692 A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		CN 1171818 A	28-01-1998
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		WO 9614419 A	17-05-1996
		JP 10503658 T	07-04-1998
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		PL 319970 A	01-09-1997
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		US 6100074 A	08-08-2000
GB 2306485 A	07-05-1997	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		AU 716583 B	02-03-2000
		AU 7323696 A	22-05-1997
		CA 2236381 A	09-05-1997
		CN 1212015 A	24-03-1999
		CZ 9801273 A	13-01-1999
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		EP 0906431 A	07-04-1999
		WO 9716553 A	09-05-1997
		JP 10503658 T	07-04-1998
		JP 2000508163 T	04-07-2000
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		NZ 320497 A	29-09-1999
		PL 319970 A	01-09-1997
		PL 326445 A	28-09-1998
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		SK 55598 A	13-04-1999
		US 6117661 A	12-09-2000
		US 6100074 A	08-08-2000
WO 0031273 A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000
WO 0009682 A	24-02-2000	AU 5347999 A	06-03-2000
US 5834297 A	10-11-1998	US 5691171 A	25-11-1997

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07253

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/70 C12N1/21 C12P17/10  
C12P17/16 C12P7/04 C12P7/22 C12P7/02 //(C12N1/21,  
C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUNRO ANDREW W ET AL: "Regional saturation mutagenesis as an approach to identification of substrate specificity determinants in cytochrome P450 BM3." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 21, no. 4, 1993, page 409S XP000971665 Biochemical Society 647th Meeting on Chromosomal Abnormalities in Cancer Cells: Identification of Molecules Important for Tumour Development; Sheffield, England, UK; July 20-23, 1993 ISSN: 0300-5127 the whole document --- -/--	1,2, 6-12, 15-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2000

Date of mailing of the international search report

11/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 00/07253

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 195 07 546 A (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA) 12 September 1996 (1996-09-12)  the whole document	1,2, 6-12, 15-18
X	GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC) 8 May 1996 (1996-05-08)  the whole document	1,2, 6-12, 15-18
X	GB 2 306 485 A (BRITISH GAS PLC) 7 May 1997 (1997-05-07)  the whole document	1,2, 6-12, 15-18
X	GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxigenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 2, 1997, pages 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-10
X	ENGLAND P A: "The oxidation of naphtalene and pyrene by cytochrome P450cam" FEBS LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 424, no. 3, 13 March 1998 (1998-03-13), pages 271-274, XP002131695 ISSN: 0014-5793 the whole document	1,2,6-12
P,X	JONES ET AL: "The oxidation of polychlorinated benzenes by genetically engineered cytochrome P450cam: potential applications in bioremediation" CHEMICAL COMMUNICATIONS,ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY,GB, no. 3, 7 February 2000 (2000-02-07), pages 247-248, XP002152716 ISSN: 1359-7345 the whole document	1,2,6-12
P,X	WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK ()) 2 June 2000 (2000-06-02) the whole document	1-3, 6-12, 15-18
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07253

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 09682 A (DAVIS CHRISTOPHER ;MAXYGEN INC (US); AFFHOLTER JOSEPH A (US); SELI) 24 February 2000 (2000-02-24) page 17, line 11 - line 24; figures 1-5 page 37, line 23 -page 38, line 21; claims 1-141	1,2, 6-12, 15-18
P, X	LI Q S ET AL: "Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst." CHEMISTRY, (2000 MAY 2) 6 (9) 1531-6. , XP000971670 the whole document	1-19
P, X	GILLAM ELIZABETH M J ET AL: "Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 265, no. 2, 19 November 1999 (1999-11-19), pages 469-472, XP002156034 ISSN: 0006-291X the whole document	1,2,6-19
A	US 5 834 297 A (KIM IN CHEOL ET AL) 10 November 1998 (1998-11-10) the whole document	
A	CHERRY JOEL R ET AL: "Directed evolution of a fungal peroxidase." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 379-384, XP002156029 ISSN: 1087-0156 cited in the application the whole document	
A	SCHWANEBERG ULRICH ET AL: "A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 269, no. 2, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 359-366, XP002156030 ISSN: 0003-2697 the whole document	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/07253

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OLIVER CATHERINE F ET AL: "Engineering the substrate specificity of Bacillus megaterium cytochrome P-450 BM3: Hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 327, no. 2, 1997, pages 537-544, XP002156031 ISSN: 0264-6021 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>ATKINS W M ET AL: "Molecular recognition in cytochrome P-450: alteration of regioselective alkane hydroxylation via protein engineering" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US; vol. 111, 1989, pages 2715-2717, XP002131692 ISSN: 0002-7863</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>SIBBESEN O ET AL: "Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 271, no. 37, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 22462-22469, XP002131693 ISSN: 0021-9258 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07253

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19507546	A	12-09-1996	WO 9627678 A	12-09-1996
GB 2294692	A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
			AU 3811795 A	31-05-1996
			CN 1171818 A	28-01-1998
			CZ 9701277 A	15-10-1997
			EP 0789770 A	20-08-1997
			WO 9614419 A	17-05-1996
			JP 10503658 T	07-04-1998
			KR 234348 B	15-12-1999
			NZ 294904 A	24-09-1998
			PL 319970 A	01-09-1997
			RU 2133774 C	27-07-1999
			SK 54597 A	04-02-1998
			US 6100074 A	08-08-2000
GB 2306485	A	07-05-1997	AU 705736 B	03-06-1999
			AU 3811795 A	31-05-1996
			AU 716583 B	02-03-2000
			AU 7323696 A	22-05-1997
			CA 2236381 A	09-05-1997
			CN 1212015 A	24-03-1999
			CZ 9801273 A	13-01-1999
			CZ 9701277 A	15-10-1997
			EP 0789770 A	20-08-1997
			EP 0906431 A	07-04-1999
			WO 9716553 A	09-05-1997
			JP 10503658 T	07-04-1998
			JP 2000508163 T	04-07-2000
			KR 234348 B	15-12-1999
			NZ 294904 A	24-09-1998
			NZ 320497 A	29-09-1999
			PL 319970 A	01-09-1997
			PL 326445 A	28-09-1998
			RU 2133774 C	27-07-1999
			SK 54597 A	04-02-1998
			SK 55598 A	13-04-1999
			US 6117661 A	12-09-2000
			US 6100074 A	08-08-2000
WO 0031273	A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000
WO 0009682	A	24-02-2000	AU 5347999 A	06-03-2000
US 5834297	A	10-11-1998	US 5691171 A	25-11-1997



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/40241-PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07253	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/53		
Anmelder BASF AKTIENGESellschaft et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  23/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  30.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Herrmann, K  Tel. Nr. +49 89 2399 2670 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-24                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-26                      mit Telefax vom                      22/10/2001

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-39, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung,                      Seiten:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07253

- ☐ Ansprüche, Nr.:  
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:  
**siehe Beiblatt**

## II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
  - ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:  
**siehe Beiblatt**

## III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:
- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
  - ☒ Ansprüche Nr. 9-11, 13-15, 17-22, 25, 26 (teilweise).

### Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 9-11, 13-15, 17-22, 25, 26 (teilweise) sind so unklar, daß kein

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07253

sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):  
siehe Beiblatt

☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 9-11, 13-15, 17-22, 25, 26 (teilweise) sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	9-23, 25, 26
	Nein: Ansprüche	1-8, 24
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	9-23, 25, 26
	Nein: Ansprüche	1-8, 24
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-26
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

## VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

### 1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

### 2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

## VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
siehe Beiblatt

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## **Dokumente**

Für diesen internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (IPER) werden die Dokumente des internationalen Recherchenbericht (ISR) vom 11.01.01 in der dort angegebenen Reihenfolge mit **D1-D17** abgekürzt.

### **Zu PUNKT I (Grundlage des Bescheids)**

- 1 Die mit Telefax vom 22.10.01 eingereichten, geänderten Ansprüche 1-26 erfüllen die Erfordernisse von Art. 34(2)(b) PCT.

Für die Beurteilung der Frage, ob ein Disclaimer (Anspruch 1) zulässig ist, gibt es unter den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Nach dem EPÜ ist ein Disclaimer nur dann zulässig, wenn das zitierte Dokument nicht von Bedeutung für die weitere Prüfung der beanspruchten Erfindung ist. Es muß sich also um eine zufällig neuheitsschädliche Offenbarung handeln, welche z.B. nicht für die Beurteilung der erfinderischen Tätigkeit von Bedeutung ist. Nach Auffassung dieser Behörde erfüllt das Dokument **D5** diese Erfordernisse jedoch nicht (keine zufällig neuheitsschädliche Offenbarung).

- 2 Die ursprünglich eingereichte Anmeldung enthält 39 Seiten Sequenzprotokoll (9 Sequenzen).

### **Zu PUNKT II (Priorität)**

Die im Recherchenbericht als P-Dokumente bezeichneten Dokumente **D7**, **D10** und **D11** sind nicht als Stand der Technik nach Regel 64(1)(a) PCT zu berücksichtigen, da der beanspruchte Prioritätstag den relevanten Teilen der vorliegenden Anmeldung zuerkannt werden kann.

### **Zu PUNKT III (Keine Erstellung eines Gutachtens)**

- 1 Aus der Beschreibung (siehe z.B. Beispiele) geht klar hervor, daß es sich bei den drei Mutationen Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln bzw. Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly der Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *B. megaterium* um die

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

technischen Merkmale handelt, welche für die Ausführung der Erfindung wesentlich sind, d.h. das objektive technische Problem, die Bereitstellung einer Cytochrom P450-Monooxygenase mit gesteigerter Indol-Turnover-Rate (Produktion von Indigo oder Indirubin) (siehe S. 20, Z. 28-30), wird nur gelöst, wenn die oben genannten Bedingungen erfüllt sind.

Da die unabhängigen Ansprüche 1, 9, 13, 19, 25 und 26 nicht alle wesentlichen technischen Merkmale der Erfindung enthalten, erfüllen sie nicht die Erfordernisse von Regel 6.3 PCT (siehe auch PCT Richtlinien III-4.4). Eine sinnvolle Prüfung ist deshalb für den Gegenstand der Ansprüche 9-11, 13-15, 17-22, 25 und 26 nicht möglich (Art. 6 und Art. 34(4)(a)(ii) PCT). Die unabhängigen Ansprüche 9, 13, 19, 25 und 26 wurden daher unter der Voraussetzung geprüft, daß sie die technischen Merkmale Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln oder Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly enthalten.

- 2 Die unabhängigen Verfahrens-Ansprüche 9, 13, 19, 25 und 26 umfassen alle Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs, welche die gewünschte Eigenschaft aufweisen, zur mikrobiologischen Oxidation einer N- oder S-heterocyclischen ein- oder mehrkernigen aromatischen Verbindung oder zur Herstellung von Indigo und/oder Indirubin geeignet zu sein. Jedoch ist nur eine begrenzte Anzahl solcher Enzyme vollständig offenbart (Art. 5 PCT) und durch die Beschreibung gestützt (Art. 6 PCT).

Ausser für die drei Mutanten (Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln und Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) der Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *B. megaterium* wurde für keine weitere P450 Monooxygenase gezeigt, daß sie die gewünschte Eigenschaft aufweist. Auf S. 20, Z. 17 der vorliegenden Beschreibung wird offenbart, daß sogar eine definierte Einfachmutante (Leu188Gln) nur eine geringe Aktivität aufweist Indol zu oxidieren.

Da die Verfahrens-Ansprüche 9, 13, 19, 25 und 26 nicht die technischen Merkmale der oben beschriebenen Mutanten enthalten, erfüllen sie nicht die Erfordernisse von Art. 5/6 PCT und werden daher unter der Voraussetzung geprüft, daß sie die technischen Merkmale Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln oder Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly enthalten.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Zu PUNKT V (Neuheit, erfinderische Tätigkeit, gewerbl. Anwendbarkeit)**

**1 Zusammenfassung der Anmeldung**

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind drei Mutanten (Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln und Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) der Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *B. megaterium*. Insbesondere besagte Dreifachmutante, auch als "F87L188A74" bezeichnet, weist eine hohe Indol-Turnover-Rate zur Produktion von Indigo auf (siehe auch S. 20, Z. 17-30 der vorliegenden Beschreibung).

**2 Neuheit (Art. 33(2) PCT)**

- 2.1 Der Gegenstand von Ansprüchen 9-23, 25 und 26 ist der Öffentlichkeit durch den zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht zugänglich gemacht worden und kann daher als neu betrachtet werden.
- 2.1 Der Gegenstand der Ansprüche 1-8 und 24 erfüllt nicht die Anforderungen von Art. 33(2) und 33(3) PCT.
- 2.2 **D14** offenbart eine Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *B. megaterium* mit veränderter Substratspezifität, welche eine Mutation an Aminosäureposition 87 aufweist (Phe87Ala). Ansprüche 1-8 sind daher in der gegenwärtigen Form unter Art. 33(2) und 33(3) PCT nicht gewährbar.
- 2.3 Die IPEA ist der Auffassung, daß **D14** auch neuheitsschädlich für den Gegenstand von Anspruch 24 ist.
- 2.4 Es wird darauf hingewiesen, daß Ausdrücke wie "gegebenenfalls" (Ansprüche 1, 10 und 25) keine Beschränkung des Schutzzumfangs des Patentanspruchs bewirken, d.h. das nach einem derartigen Ausdruck stehende Merkmal ist als ganz und gar fakultativ bzw. optional (nicht zwingend) zu betrachten (Richtlinien C-III, 4.6).

Die "Funktion" der Cytochrom P450 Monooxygenase ist in Anspruch 1 nur vage

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



definiert (Begriff "gegebenenfalls"). Daher bewirken die Ausdrücke "funktionelle Mutation" (Anspruch 1) und "funktionale Äquivalente" (Anspruch 3) keine Einschränkung des Schutzzumfangs besagter Ansprüche.

### **3 Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)**

- 3.1 Der Gegenstand der Ansprüche 9-23, 25 und 26 ergibt sich nicht in naheliegender Weise aus dem zur Verfügung stehenden Stand der Technik und erfüllt daher die Erfordernisse von Art. 33(3) PCT.
- 3.2 **D5** und **D14** offenbaren bereits Cytochrom P450 Monooxygenasen BM-3 aus *B. megaterium* mit veränderter Substratspezifität. Das Enzym von **D5** weist z.B. eine Mutation an Aminosäureposition 87 auf (Phe87Val). Das Enzym von **D14** weist ebenfalls eine Mutation an Aminosäureposition 87 auf (Phe87Ala). Cytochrom P450 Monooxygenasen mit veränderter Substratspezifität wurden ebenfalls bereits in **D1**, **D3**, **D4**, **D6**, **D15** und **D16** beschrieben.
- 3.3 Vor dem Prioritätstag der vorliegenden Anmeldung ist es ebenfalls gelungen, Indigo auf mikrobiologischem Weg herzustellen ("It is well-established that indigo may be prepared by microbial transformation") (siehe D5, S. 1533, rechte Spalte, Zitate 28 und 29 und Abb. 1). Auch **D12** beschreibt bereits eine Methode zur Herstellung von Indigo unter Verwendung von rekombinanten Bakterien.
- 3.4 Der Stand der Technik beschreibt jedoch nicht auf naheliegende Weise ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation/Herstellung einer in den unabhängigen Ansprüchen definierten Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mutante der Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *B. megaterium* verwendet, wobei die Mutante wenigstens eine der drei Mutationen Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln oder Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly aufweist.

### **4 Industrielle Verwertbarkeit (Art. 33(4) PCT)**

Ansprüche 1-26 erfüllen die Anforderungen von Art. 33(4) PCT.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Zu PUNKT VI                      Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO0031273	02.06.00	19.11.99	19.11.98
WO0009682	24.02.00	12.08.99	12.08.98

Besagte Dokumente sind zwischen dem Prioritätstag und dem Anmeldetag der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht worden und sind daher nicht als Stand der Technik im Sinne von Regel 64(1)(b) PCT anzusehen. WO0031273 (**D8**) und WO0009682 (**D9**) beanspruchen jedoch ein früheres Prioritätsdatum als die vorliegende Anmeldung und werden daher in der regionalen Phase für die Beurteilung der Neuheit des beanspruchten Gegenstands von Bedeutung sein.

**Zu PUNKT VII                      (Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung)**

Aufgrund der Vielzahl unabhängiger Ansprüche mangelt es der Anmeldung insgesamt an Knappheit (Regel 6.1(a) PCT). 4 unabhängige Ansprüche beziehen sich auf keinen anderen Anspruch. Die unabhängigen Ansprüche 9, 13 19, 25 und 2 befassen sich z.B. alle mit einem "Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer Verbindung".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/03/1996  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M/40241-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/07253	International filing date (day/month/year) 27 July 2000 (27.07.00)	Priority date (day/month/year) 27 July 1999 (27.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 9/02, 15/70, 1/21, C12P 17/10, 17/16, 7/04, 7/22, 7/02, C12N 1/21		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 February 2001 (23.02.01)	Date of completion of this report 30 October 2001 (30.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07253

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-24 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1-26 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 22 October 2001 (22.10.2001)
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-39 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

### Documents

For this international preliminary examination report the documents of the international search report dated January 11, 2001 are abbreviated as **D1-D17** in the order specified therein.

1. Claims 1-26 amended by fax submitted on October 22, 2001 meet the requirements of PCT Article 34(2)(b).

The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing whether a disclaimer (Claim 1) is permissible. According to the PCT, a disclaimer is only permissible if the cited document is of no significance for the further examination of the claimed invention. Therefore it must involve a coincidental disclosure prejudicial to novelty which, for example, is of no significance for the evaluation of inventive step. However, in the opinion of this authority document **D5** does not meet these requirements (no coincidental disclosure prejudicial to novelty).

2. The application originally submitted contains 39 pages of sequence protocols (9 sequences).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07253

## II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:  
☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.  
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See the supplemental box

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I I

Documents **D7**, **D10** and **D11** identified in the search report as P documents cannot be considered as prior art under PCT Rule 64.1(a) as the claimed priority date can be granted to the relevant parts of the present application.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07253

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 9-11,13-15,17-22,25,26 (in part)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 9-11,13-15,17-22,25,26 (in part)  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 9-11,13-15,17-22,25,26 (in part) are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I I I

1. From the description (see examples) it is clear that the three mutations Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln or Phe87Val, Leu188Gln and Ala74Gly of the cytochrome P450 monooxygenase BM-3 from *B.megaterium* involve technical features which are important for carrying out the invention, i.e. the objective technical problem - the preparation of a cytochrome P-450 monooxygenase with increased indole turnover rate (production of indigo or indirubin) (see page 20, lines 28-30) - is only solved if the above-mentioned conditions are fulfilled.

Because the independent Claims 1, 9, 13, 19, 25 and 26 do not contain all the essential technical features of the invention they do not meet the requirements of PCT Rule 6.3 (see also PCT Guidelines III-4.4). A meaningful examination is therefore impossible for the subject matter of Claims 9-11, 13-15, 17-22, 25 and 26 (PCT Articles 6 and 34(4)(a)(ii)). The independent Claims 9, 13, 19, 25 and 26 were therefore examined on the assumption that they contain the technical features Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln or Phe87Val, Leu188Gln and Ala74Gly.

2. The independent method Claims 9, 13, 19, 25 and 26 all cover cytochrome P450 monooxygenases of bacterial origin which display the desired characteristic of being suitable for microbiological oxidation of an N or S heterocyclical mono- or multinuclear aromatic compound, or for the production of indigo and/or

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

indirubin. However, only a limited number of such enzymes have been fully disclosed (PCT Article 5) and supported by the description (PCT Article 6).

Apart from the three mutations (Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln and Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) of the cytochrome P450 monooxygenase Bm-3 from *B.megaterium*, there is no indication that any other P450 monooxygenases contain the desired characteristic. Page 20, line 17 of the present description discloses that even a specific single mutation (Leu188Gln) only demonstrates a low indole-oxidising activity.

Since the method Claims 9, 13, 19, 25 and 26 do not contain the technical features of the mutations described above, they do not meet the requirements of PCT Articles 5 and 6 and are therefore examined on the assumption that they contain the technical features Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln or Phe87Val, Leu188Gln and Ala74Gly.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	9-23, 25, 26	YES
	Claims	1-8, 24	NO
Inventive step (IS)	Claims	9-23, 25, 26	YES
	Claims	1-8, 24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Summary of the application

The present application concerns three mutations (Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln and Phe87Val, Leu188Gln and Ala74Gly) of the cytochrome P450 monooxygenase BM-3 from *B. megaterium*. In particular the said triple mutation, also identified as "F87L188A74", displays a high indole turnover rate for the production of indigo (see also page 20, lines 17-30 of the present application).

#### 2. Novelty (PCT Article 33(2))

2.1 The subject matter of Claims 9-23, 25 and 26 has not been made public in the existing prior art and therefore can be considered novel.

2.2 The subject matter of Claims 1-8 and 24 does not meet the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3).

2.3 **D14** discloses a cytochrome P450 monooxygenase Bm-3 from *B. megaterium* with altered substrate specificity which displays a mutation at amino acid

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

position 87 (Phe87Ala). Therefore, Claims 1-8 cannot be accepted in their current form under PCT Article 33(2) and (3).

2.4 The international preliminary examining authority is of the opinion that **D14** is also prejudicial to novelty for the subject matter of Claim 24.

2.5 It should be noted that expressions such as "optionally" (Claims 1, 10 and 25) do not restrict the scope of a claim. Consequently any feature preceded by such an expression is regarded as entirely optional (not compulsory) (see PCT Guidelines, Chapter III, 4.6)

The "function" of the cytochrome P450 monooxygenase is only vaguely defined in Claim 1 (concept "optionally"). For this reason the expressions "functional mutation" (Claim 1) and "functional equivalents" (Claim 3) do not restrict the scope of protection for the said claims.

### 3. Inventive Step (PCT Article 33(3))

3.1 The subject matter of Claims 9-23, 25 and 26 are not obvious from the available prior art and therefore meet the requirements of PCT Article 33(3).

3.2 **D5** and **D14** already disclose cytochrome P450 monooxygenases Bm-3 from *B.megaterium* with altered substrate specificity. For example, the enzyme in **D5** displays a mutation at amino acid position 87 (Phe87Val). The enzyme in **D14** also displays a mutation at amino acid position 87 (Phe87Ala). Cytochrome P450 monooxygenases with altered

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



substrate specificity have also already been described in **D1**, **D3**, **D4**, **D6**, **D15** and **D16**.

3.3 Before the priority date of the present application it had been possible to produce indigo microbiologically ("It is well-established that indigo may be prepared by microbial transformation") (see D5, page 1533, right-hand column, references 28 and 29 and Figure 1). **D12** has also already described a method for the production of indigo using recombinant bacteria.

3.4 However, the prior art does not obviously describe a method for the microbiological oxidation of a compound identified in the independent claims, characterised by the fact that it uses a mutation of cytochrome P450 monooxygenase BM-3 from *B. megaterium* in which the mutant contains at least one of the three mutations Phe87Val; Phe87Val, Leu188Gln or Phe87Val, Leu188Gln or Ala74Gly.

#### 4. Industrial applicability (PCT Article 33(4))

Claims 1-26 meet the requirements of PCT Article 33(4).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO0031273	02.06.00	19.11.99	19.11.98
WO0009682	24.02.00	12.08.99	12.08.98

The said documents were published between the priority date and the filing date of the present application and therefore cannot be considered as prior art within the meaning of PCT Rule 64.1(b). However, WO0031273 (D8) and WO0009682 (D9) claim an earlier priority date than the present application and will therefore be of significance in the regional phase for assessing the novelty of the claimed subject matter.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07253

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Due to its many independent claims the application displays an overall lack of clarity (PCT Rule 6.1(a)). Four of the independent claims refer to no other claim. For example, the independent Claims 9, 13, 19 25 and 2 all relate to a "method for the microbiological oxidation of a compound".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

JG13 Rec'd PCT/PTO 17 JAN 2002

1

Patentansprüche:

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, welche zu wenigstens einer der folgenden Reaktionen befähigt ist:

- 5 a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder S-heterocyclischer ein- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen;
- b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder mehrkerniger Aromaten;
- c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und Alkene;
- 10 d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane und Cycloalkene;

wobei die Monooxygenase abgeleitet ist von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funktionelle Mutation in wenigstens einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335, 352-356, 73-82 und 86-88 aufweist; ausgenommen der Einfachmutante Phe87Val.

15

2. Monooxygenase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine funktionelle Mutation in wenigstens einem der Sequenzbereiche 73-82, 86-88 und 172-224 aufweist.

20

3. Monooxygenase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

25

- a) Phe87Val, Leu100Gln, oder \_\_\_\_\_
- b) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;

sowie funktionale Äquivalente davon, welche zu wenigstens einer der obigen Oxidationsreaktionen befähigt sind.

30

4. Nukleinsäuresequenz, kodierend für eine Monooxygenase nach einem der

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



vorherigen Ansprüche.

5. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 4 umfasst.

6. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt nach Anspruch 5.

7. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 6.

8. Mikroorganismus nach Anspruch 7, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*.

9. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer N- oder S-heterocyclischen ein- oder mehrkernigen aromatischen Verbindung, dadurch gekennzeichnet, dass man

a1) einen rekombinanten Mikroorganismus, welcher eine Cytochrom P450 Monooxygenase bakteriellen Ursprungs exprimiert, in einem Kulturmedium, in Gegenwart eines exogenen oder intermediär gebildeten Substrats, kultiviert; oder

a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase bakteriellen Ursprungs inkubiert; und

b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter gegebenenfalls substituierten N- oder S-heterocyclischen ein- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Monooxygenase eine Mutante nach einem der Ansprüche 1 bis 3 einschließlich der Mutante Phe87Val ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Mutante wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- a) Phe87Val;
- b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
- c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly.

13. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer Verbindung gemäß der Definition in Anspruch 1 b), c) oder d), dadurch gekennzeichnet, dass man

a1) einen rekombinanten Cytochrom P450 produzierenden Mikroorganismus nach Anspruch 7 oder 8 in einem Kulturmedium, in Gegenwart eines exogenen oder intermediär gebildeten Substrats, kultiviert; oder

a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 3 inkubiert; und

b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert;

wobei die Monooxygenase-Mutante Phe87Val nicht ausgeschlossen ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter:

- a) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- b) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- c) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei die Monooxygenase eine Mutante nach einem der Ansprüche 1 bis 3 einschließlich der Mutante Phe87Val ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Mutante wenigstens eine der folgen-

**THIS PAGE BLANK (USPFO)**

den ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- a) Phe87Val;
- b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
- c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly.

5

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis d) von Verbindungen, einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltigen Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

10

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man als exogenes Substrat eine Verbindung, ausgewählt unter Indol, n-Hexan, n-Octan, n-Decan, n-Dodecan, Cumol, 1-Methylindol, 5-Cl- oder Br-Indol, Inden, Benzothiofophen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Ionon, Acridin, Naphthalin, 6-Methyl- oder 8-Methylchinolin, Chinolin und Chinaldin, einsetzt.

20

19. Verfahren zur mikrobiologischen Produktion von Indigo und/oder Indirubin, dadurch gekennzeichnet, dass man

a1) einen rekombinanten, eine Indol-oxidierende Cytochrom P450 produzierenden Mikroorganismus in einem Kulturmedium, in Gegenwart von exogenem oder intermediär gebildetem Indol, kultiviert; oder

25

a2) ein Indol-haltiges Reaktionsmedium mit einer Indol-oxidierenden Cytochrom P450 Monooxygenase inkubiert; und

b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert;

30

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Medium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediär gebildetem Indol erzeugt wurde.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass man die Indoloxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei die Monooxygenase eine Mutante nach einem der Ansprüche 1 bis 3 einschließlich der Mutante Phe87Val ist.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Mutante wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:
  - a) Phe87Val;
  - b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
  - c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly.
24. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 7 oder 8 in immobilisierter Form.
25. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Vektors nach Anspruch 6, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 7 oder 8 zur mikrobiologischen Oxidation von
  - a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
  - b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
  - c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen; und/oder
  - d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.wobei die Monooxygenase-Mutante Phe87Val nicht ausgeschlossen ist.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



6

26. Verwendung eines Indol-oxidierenden Cytochrom P450 produzierenden Mikroorganismus zur Herstellung von Indigo und/oder Indirubin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

REPLACED BY  
ART 34 AMDT  
We claim:

40

1. A cytochrome P450 monooxygenase which is capable of at least  
5 one of the following reactions:
  - a) oxidation of unsubstituted or substituted N-, O- or S-heterocyclic mono- or polynuclear aromatic compounds;
  - b) oxidation of unsubstituted or substituted mono- or  
10 polynuclear aromatics;
  - c) oxidation of straight-chain or branched alkanes and alkenes;
  - d) oxidation of unsubstituted or substituted cycloalkanes and cycloalkenes.
- 15 2. A monooxygenase as claimed in claim 1, derived from cytochrome P450 monooxygenases of bacterial origin.
3. A monooxygenase as claimed in claim 2, derived from  
20 cytochrome P450 monooxygenase BM-3 from *Bacillus megaterium* having an amino acid sequence according to SEQ ID NO:2, which has at least one functional mutation in at least one of the amino acid sequence regions 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335, 352-356, 73-82 and 86-88.
- 25 4. A monooxygenase as claimed in claim 3, which has at least one functional mutation in at least one of the sequence regions 73-82, 86-88 and 172-224.
- 30 5. A monooxygenase as claimed in claim 4, which has at least one of the following mono- or polyamino acid substitutions:
  - a) Phe87Val;
  - b) Phe87Val, Leu188Gln; or
  - c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;
  - 35 and functional equivalents thereof.
6. A nucleic acid sequence coding for a monooxygenase according to one of the preceding claims.
- 40 7. An expression construct comprising, under the genetic control of regulatory nucleic acid sequences, a coding sequence which comprises a nucleic acid sequence according to claim 6.
8. A vector comprising at least one expression construct  
45 according to claim 7.

10/15/2014  
10/15/2014

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9. A recombinant microorganism transformed by at least one vector as claimed in claim 8.
10. A microorganism as claimed in claim 9, selected from bacteria of the genus *Escherichia*.
11. A process for the microbiological oxidation of a compound as defined in claim 1, which comprises
- a1) culturing a recombinant microorganism as claimed in claim 9 or 10 in a culture medium, in the presence of an exogenous or intermediately formed substrate; or
- a2) incubating a substrate-containing reaction medium with an enzyme as claimed in one of claims 1 to 5; and
- b) isolating the oxidation product formed or a secondary product thereof from the medium.
12. A process as claimed in claim 11, wherein the exogenous or intermediately formed substrate is selected from the group consisting of
- a) unsubstituted or substituted N-, O- or S-heterocyclic mono- or polynuclear aromatic compounds;
- b) unsubstituted or substituted mono- or polynuclear aromatics;
- c) straight-chain or branched alkanes and alkenes;
- d) unsubstituted or substituted cycloalkanes and cycloalkenes.
13. A process as claimed in claim 12, wherein the substrate is intermediately formed indole and the indigo and/or indirubin which is generated by oxidation of intermediately formed indole is isolated from the medium.
14. A process as claimed in claim 13, wherein the indole oxidation is carried out by culturing the microorganisms in the presence of oxygen at a culturing temperature of approximately 20 to 40°C and a pH of approximately 6 to 9.
15. A process as claimed in claim 11, wherein, as exogenous substrate, at least one compound selected from the compound groups a) to d) defined above is added to a medium and the oxidation is carried out by enzymatic conversion of the substrate-containing medium in the presence of oxygen at a temperature of about 20 to 40°C and a pH of about 6 to 9, where the substrate-containing medium additionally contains

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

an about 10- to 100-fold molar excess, based on the substrate, of reduction equivalents.

16. A process as claimed in claim 15, wherein the exogenous  
5 substrate used is a compound selected from the group  
consisting of indole, n-hexane, n-octane, n-decane,  
n-dodecane, cumene, 1-methylindole, 5-Cl- or Br-indole,  
indene, benzothiophene,  $\alpha$ - $\beta$ - and  $\gamma$ -ionone, acridine,  
10 naphthalene, 6-methyl- or 8-methylquinoline, quinoline and  
quinaldine.
17. A bioreactor comprising an enzyme as claimed in one of claims  
1 to 5 or a recombinant microorganism as claimed in one of  
15 claims 9 or 10 in immobilized form.
18. The use of a cytochrome P450 monooxygenase as claimed in one  
of claims 1 to 5, of a vector as claimed in claim 8, or of a  
20 microorganism as claimed in claim 9 or 10 for the  
microbiological oxidation of
- a) unsubstituted or substituted N-, O- or S-heterocyclic  
mono- or polynuclear aromatic compounds;
  - b) unsubstituted or substituted mono- or polynuclear  
25 aromatics;
  - c) straight-chain or branched alkanes and alkenes; and/or
  - d) unsubstituted or substituted cycloalkanes and  
cycloalkenes.
19. The use as claimed in claim 18 for the preparation of indigo  
30 and/or indirubin.

35

40

45

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## Abstract

The invention relates to novel cytochrome P450 monooxygenases  
5 with modified substrate specificity, nucleotide sequences coding  
therefor, expression constructs and vectors comprising these  
sequences, microorganisms transformed therewith, processes for  
the microbiological oxidation of various organic substrates, such  
as, for example processes for the preparation of indigo and  
10 indirubin.

15

20

25

30

35

40

45

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/031146

JG13 Rec'd PCT/PTO 17 JAN 2002

1

We claim:

1. A cytochrome P450 monooxygenase which is capable of at least  
5 one of the following reactions:  
a) oxidation of optionally substituted N-, O- or  
S-heterocyclic mono- or polynuclear aromatic compounds;  
b) oxidation of optionally substituted mono- or polynuclear  
10 aromatics;  
c) oxidation of straight-chain or branched alkanes and  
alkenes;  
d) oxidation of optionally substituted cycloalkanes and  
cycloalkenes;
- 15 where the monooxygenase is derived from cytochrome P450  
monooxygenase BM-3 from *Bacillus megaterium* having an amino  
acid sequence according to SEQ ID NO:2, which has at least  
one functional mutation in at least one of the amino acid  
20 sequence regions 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335,  
352-356, 73-82 and 86-88; except the single mutant Phe87Val.
2. A monooxygenase as claimed in claim 1, which has at least one  
functional mutation in at least one of the sequence regions  
25 73-82, 86-88 and 172-224.
3. A monooxygenase as claimed in claim 1, which has at least one  
of the following mono- or polyamino acid substitutions:  
a) Phe87Val, Leu188Gln; or  
b) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;  
30 and functional equivalents thereof which are capable of at  
least one of the above oxidation reactions.
- Sub 01 4. A nucleic acid sequence coding for a monooxygenase according  
35 to one of the preceding ~~claims~~.
5. An expression construct comprising, under the genetic control  
of regulatory nucleic acid sequences, a coding sequence which  
comprises a nucleic acid sequence according to claim 4.
- 40 6. A vector comprising at least one expression construct  
according to claim 5.
7. A recombinant microorganism transformed by at least one  
45 vector as claimed in claim 6.

AMENDED SHEET

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

0050/50915

2

8. A microorganism as claimed in claim 7, selected from bacteria of the genus *Escherichia*.

9. A process for the microbiological oxidation of an N- or S-heterocyclic mono- or polynuclear aromatic compound, which comprises

a1) culturing a recombinant microorganism which expresses a cytochrome P450 monooxygenase of bacterial origin in a culture medium, in the presence of an exogenous or intermediately formed substrate; or

a2) incubating a substrate-containing reaction medium with a cytochrome P450 monooxygenase of bacterial origin; and

b) isolating the oxidation product formed or a secondary product thereof from the medium.

10. A process as claimed in claim 9, wherein the exogenous or intermediately formed substrate is selected from optionally substituted N- or S-heterocyclic mono- or polynuclear aromatic compounds.

20

11. A process as claimed in claim 9 or 10, where the monooxygenase is a mutant as claimed in any of claims 1 to 3, including the mutant Phe87Val.

12. A process as claimed in claim 11, where the mutant has at least one of the following mono- or polyamino acid substitutions:

a) Phe87Val;

b) Phe87Val, Leu188Gln; or

c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly.

30

13. A process for microbiological oxidation of a compound as defined in claim 1b), c) or d), which comprises

a1) culturing a recombinant cytochrome P450-producing microorganism as claimed in claim 7 or 8 in a culture medium, in the presence of an exogenous or intermediately formed substrate; or

a2) incubating a substrate-containing reaction medium with a cytochrome P450 monooxygenase as claimed in any of claims 1 to 3; and

b) isolating the oxidation product formed or a secondary product thereof from the medium;

where the monooxygenase mutant Phe87Val is not excluded.

14. A process as claimed in claim 13, wherein the exogenous or intermediately formed substrate is selected from:

AMENDED SHEET

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3

- a) optionally substituted mono- or polynuclear aromatics;
- b) straight-chain or branched alkanes and alkenes;
- c) optionally substituted cycloalkanes and cycloalkenes.

5

15. A process as claimed in claim 13 or 14, where the monooxygenase is a mutant as claimed in any of claims 1 to 3, including the mutant Phe87Val.

10 16. A process as claimed in claim 15, where the mutant has at least one of the following mono- or polyamino acid substitutions:

- a) Phe87Val;
- b) Phe87Val, Leu188Gln; or
- 15 c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly.

Sub  
A5  
20

17. A process as claimed in any of claims 9 to 16, wherein, as exogenous substrate, at least one compound selected from the groups a) to d) of compounds defined above is added to a medium and the oxidation is carried out by enzymatic reaction of the substrate-containing medium in the presence of oxygen at a temperature of approximately 20 to 40°C and a pH of approximately 6 to 9, where the substrate-containing medium additionally contains an approximately 10- to 100-fold molar excess of reduction equivalents based on the substrate.

25

18. A process as claimed in claim 17, wherein, as exogenous substrate, a compound selected from indole, n-hexane, n-octane, n-decane, n-dodecane, cumene, 1-methylindole,  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -ionone, acridine, naphthalene, 6-methyl- or 8-methylquinoline, quinoline and quinaldine is employed.

30

Sub  
A6  
35

19. A process for the microbiological production of indigo and/or indirubin, which comprises

- a1) culturing a recombinant microorganism which produces an indole-oxidizing cytochrome P450 in a culture medium, in the presence of exogenous or intermediately formed indole; or
- a2) incubating an indole-containing reaction medium with an indole-oxidizing cytochrome P450 monooxygenase; and
- 40 b) isolating the oxidation product formed or a secondary product thereof from the medium;

40

20. A process as claimed in claim 19, wherein the indigo and/or indirubin obtained, which was produced by oxidation of intermediately formed indole, is isolated from the medium.

45

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4

21. A process as claimed in claim 20, wherein the indole oxidation is carried out by culturing the microorganisms in the presence of oxygen at a culturing temperature of approximately 20 to 40°C and a pH of approximately 6 to 9.

5

22. A process as claimed in claim 20 or 21, where the monooxygenase is a mutant as claimed in any of claims 1 to 3 including the mutant Phe87Val.

- Sub  
07  
10 23. A process as claimed in claim 22, where the mutant has at least one of the following mono- or polyamino acid substitutions:

- 15 a) Phe87Val;  
b) Phe87Val, Leu188Gln; or  
c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly.

- 20 24. A bioreactor comprising an enzyme as claimed in one of claims 1 to 3 or a recombinant microorganism as claimed in one of claims 7 or 8 in immobilized form.

- 25 25. The use of a cytochrome P450 monooxygenase as claimed in one of claims 1 to 3, of a vector as claimed in claim 6, or of a microorganism as claimed in claim 7 or 8 for the microbiological oxidation of

- 30 a) optionally substituted N-, O- or S-heterocyclic mono- or polynuclear aromatic compounds;  
b) optionally substituted mono- or polynuclear aromatics;  
c) straight-chain or branched alkanes and alkenes; and/or  
d) optionally substituted cycloalkanes and cycloalkenes,  
where the monooxygenase mutant Phe87Val is not excluded.

- 35 26. The use of a microorganism producing indole-oxidizing cytochrome P450 for the preparation of indigo and/or indirubin.

40

45

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KINZEBACH, Werner  
Reitstötter, Kinzebach & Partner  
Sternwartstrasse 4  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 14 juin 2001 (14.06.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M/40241-PCT	
International application No. PCT/EP00/07253	International filing date (day/month/year) 27 juillet 2000 (27.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address APPEL, Daniel August-Lämmle-Weg 5 D-74348 Lauffen Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The person indicated in Box No. 2 has been added as inventor/applicant for the US only.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Elisabeth KÖNIG
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 April 2001 (09.04.01)	
International application No. PCT/EP00/07253	Applicant's or agent's file reference M/40241-PCT
International filing date (day/month/year) 27 July 2000 (27.07.00)	Priority date (day/month/year) 27 July 1999 (27.07.99)
Applicant HAUER, Bernhard et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 23 February 2001 (23.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election



was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Peggy Steunenberg Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Neue Cytochrom P450-Monooxygenasen und deren Verwendung zur Oxidation von organischen Verbindungen

### 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monooxygenasen mit veränderter Substratspezifität, welche zur Oxidation organischer Substrate, wie z.B. N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen, befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation unterschiedlicher, organischer Substrate, wie N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

Enzyme mit neuartigen Funktionen und Eigenschaften können entweder durch Screening natürlicher Proben oder durch Protein Engineering bekannter Enzyme bereitgestellt werden. Die letztgenannte Methode kann unter Umständen die geeignetere sein, um Eigenschaften zu induzieren, deren Generierung auf dem Wege natürlicher Selektion unwahrscheinlich ist. Trotz zahlreicher Anstrengungen zum Engineering von Enzymen gibt es bisher nur wenige erfolgreiche Studien zur Förderung der katalytischen Aktivität von Enzymmutanten bezüglich eines bestimmten Substrates (1-10). In diesen bekannten Fällen sind die Substrate strukturell eng verwandt mit dem nativen Substrat des jeweiligen Enzyms. Bisher gibt es keine Berichte über ein erfolgreiches Engineering von Enzymen, welche nach der Modifikation die Umsetzung einer Verbindung katalysieren, welche strukturell völlig verschieden vom nativen Substrat des Enzyms ist.

Die aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* isolierbare Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge (11-13). Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12 werden nicht hydroxyliert (11).

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt (14-16). Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der

## 2

Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind (14). Die Mutation von Arg47 zu Glu bewirkt eine Inaktivierung des Enzyms für Arachidonsäure (13), erhöht jedoch dessen Aktivität gegenüber C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-Alkyltrimethylammonium-Verbindungen (17). Eine Substratnutzung für aromatische Verbindungen, insbesondere ein-, zwei- oder mehrkernige, gegebenenfalls heterocyclische, Aromaten, Alkane, Alkene, Cycloalkane und -alkene, wurde für dieses Enzym nicht beschrieben. Es wurde deshalb bisher in der Fachwelt angenommen, daß andere als die bisher beschriebenen organischen Substrate, wie z.B. Indol, aufgrund der deutlichen strukturellen Unterschiede zu den nativen Substraten von P450 BM-3, insbesondere aufgrund des Fehlens funktioneller Gruppen, welche an die oben erwähnten Reste in der Substrattasche binden könnten, keine Substrat darstellen.

- 15 Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung neue Cytochrom P450 Monooxygenasen mit veränderter Substratspezifität oder verändertem Substratprofil bereit zu stellen. Insbesondere sollten Monooxygenase-Mutanten bereitgestellt werden, welche im Vergleich zu dem nichtmutierten Wildtyp-Enzym mit strukturell deutlich anderen Substraten enzymatisch aktiv sind.

Ein "verändertes Substratprofil" ist für die erfindungsgemäßen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zu beobachten. Man beobachtet für die jeweilige Mutante insbesondere eine Verbesserung der Reaktivität, wie z. B. eine Erhöhung der spezifischen Aktivität (ausgedrückt als nmol umgesetztes Substrat/Minute/nmol P450-Enzym), und/oder wenigstens eines kinetischen Parameters, ausgewählt unter K<sub>cat</sub>, K<sub>m</sub> und K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> (z.B. um mindestens 1 %, wie etwa 10 bis 1000 %, 10 bis 500 %, oder 10 bis 100 %) bei Umsetzung zumindest einer der in den Gruppen a) bis d) definierten oxidierbaren Verbindungen. Die erfindungsgemäße Oxidationsreaktion umfasst die enzymkatalysierte Oxigenierung wenigstens eines exogenen (d.h. dem Reaktionsmedium zugesetzten) oder endogenen (d.h. im Reaktionsmedium bereits vorhandenen) organischen Substrats. Insbesondere umfasst die erfindungsgemäße Oxidationsreaktion eine Mono- und oder Polyhydroxylierung, wie z.B. eine Mono- und/oder Dihydroxylierung, an einer aliphatischen oder aromatischen C-H-Gruppe, oder eine Epoxidierung an einer vorzugsweise nichtaromatischen C=C-Gruppe. Auch Kombinationen obiger Reaktionen sind denkbar. Das unmittelbare Reaktionsprodukt kann außerdem im Rahmen einer nichtenzymatischen Folge- oder Nebenreaktion weiter umgewandelt werden. Derartige Kombinationen von enzymatischen und nichtenzymatischen Prozessen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- 45 Die obige Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch neuartige Cytochrom P450 Monooxygenasen, welche z.B. zur Oxi-



## 3

tion N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen befähigt sind.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung solche Monooxygenasen, deren Substrat-bindender Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme neuer, wie z.B. N-heterocyclischer Substrate, befähigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die neuen Monooxygenase löslich, d.h. in nicht-membrangebundener Form existent, und in dieser Form enzymatisch aktiv.

Die erfindungsgemäßen Monooxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs, wie insbesondere abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funktionelle, d.h. die Oxidation neuer organischer Substrate (vgl. insbesondere die im Folgenden definierten Gruppen a) bis d) von Verbindungen), wie z.B. N-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, fördernde Mutation, in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224 (F/G-loop-Bereich), 39-43 ( $\beta$ -strand 1), 48-52 ( $\beta$ -strand 2), 67-70 ( $\beta$ -strand 3), 330-335 ( $\beta$ -strand 5), 352-356 ( $\beta$ -strand 8), 73-82 (helix 5) und 86-88 (helix 6) aufweist.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten Cytochrom P450 Monooxygenase-Mutanten, sind bevorzugt zu wenigstens einer der folgenden Reaktionen befähigt:

- a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder S-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen;
- b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder mehrkerniger Aromaten;
- c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und Alkene; und
- d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane und Cycloalkene

Bevorzugte Monooxygenase-Mutanten weisen wenigstens eine funktionelle Mutation, insbesondere Aminosäuresubstitution, in wenigstens einem der Sequenzbereiche 73-82, 86-88 und 172-224 auf. So kann beispielsweise Phe87 ersetzt sein durch eine Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Ala, Val, Leu, insbesondere Val; Leu188 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit Amid-Seitenkette, wie z. B. Asn oder insbesondere Gln; und Ala74 kann ersetzt sein durch eine andere Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Val und insbesondere Gly.

## 4

Besonders bevorzugten Monooxygenase-Mutanten dieses Typs sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- 1) Phe87Val;
- 2) Phe87Val, Leu188Gln; oder
- 3) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;

sowie funktionale Äquivalente davon. Der Zahlenwert gibt dabei die Position der Mutation an; vor dem Zahlenwert steht die ursprüngliche, hinter dem Zahlenwert die neu eingeführte Aminosäure.

"Funktionale Äquivalente" oder Analoga der konkret offenbarten Mutanten sind in diesem Zusammenhang davon verschiedene Mutanten, welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität im Rahmen wenigstens einer der oben bezeichneten Oxidationsreaktionen a) bis d), also beispielsweise gegenüber heterozyklischen Aromaten, besitzen und z.B. Indol hydroxylieren, oder weiterhin das gewünschte, im Vergleich zum Wildtyp-Enzym "veränderte Substratprofil" zeigen.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß auch Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäuresubstitution aufweisen, aber trotzdem zu einer Mutante führen, die ebenso wie die konkret genannte Mutante ein gegenüber dem Wildtypenzym "verändertes Substratprofil" zeigen und wenigstens eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Veränderungen im Substratprofil qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate aber mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenase-Mutanten, welche in gleicher Weise wie die konkret genannten P450 BM3-Mutanten durch Mutation von P450-Enzymen aus anderen Organismen zugänglich sind. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen. Mit den modernen Methoden des Molecular Modeling können dann in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente, das Reaktionsmuster beeinflussende Mutationen vorgenommen werden.

"Funktionale Äquivalente" umfassen ebenso die durch eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten zusätzlichen Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit verändertem Substratprofil im obigen Sinne führen.

## 5

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe a) sind gegebenenfalls substituierte heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen; insbesondere oxidierbare oder hydroxylierbare N-, O- oder S-heterocyclische ein-, zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen. Sie umfassen vorzugsweise zwei oder drei, insbesondere zwei, vier- bis siebengliedrige, insbesondere sechs- oder fünfgliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der aromatischen Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-, O- oder S-Heteroatom im Ring trägt. In der gesamten Ringstruktur können gegebenenfalls ein oder zwei weitere gleiche oder verschiedene Heteroatome enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl oder C<sub>2</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete heterocyclische Substrate sind insbesondere zweikernige Heterocyclen, wie Indol, N-Methylindol und die mit ein bis drei der oben definierten Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon, wie z.B. 5-Chlor- oder 5-Brom-indol; sowie Chinolin und Chinolinderivate, wie z.B. 8-Methylchinolin, 6-Methylchinolin und Chinaldin; und Benzothiophen und die mit ein bis drei der oben definierten Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon. Außerdem seien genannt dreikernige Heteroaromaten wie Acridin und die mit ein bis drei der oben definierten Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe b) sind gegebenenfalls substituierte ein- oder mehrkernige, insbesondere ein- oder zweikernige Aromaten, wie Benzol und Naphthalin. Die aromatischen Verbindungen können gegebenenfalls ein oder mehrfach substituiert sein und z.B. 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoffatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkyl, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl oder n-, i- oder t- Butyl, oder C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkenyl, wie Ethenyl, 1-Propenyl, 2-Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl oder 3-Butenyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Die genannten Alkyl- oder Alkenylsubstituenten können gegebenenfalls auch eine Keto- oder Aldehydgruppe aufweisen; Beispiele hierfür sind Propan-2-on-3-yl, Butan-2-on-4-yl, 3-Buten-2-on-4-yl. Der Aromat kann gegebenenfalls mit einem vier- bis siebengliedrigen, nichtaromatischen Ring kondensiert sein. Der nichtaromatische Ring kann gegebenenfalls eine oder zwei C=C-Doppelbindungen aufweisen, ein- oder mehrfach mit oben genannten

## 6

Substituenten substituiert sein und gegebenenfalls ein oder zwei Ringheteroatome tragen. Beispiele für besonders brauchbare Aromaten sind einkernige Aromaten, wie Cumol, sowie zweikernige Substrate, wie Inden und Naphthalin, sowie die mit ein bis drei der  
5 oben definierten Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe c) sind geradkettige oder verzweigte Alkane oder Alkene mit 4 bis 15, vorzugsweise 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Als Beispiele können genannt  
10 werden n-Butan, n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan-, n-Oktan, n-Nonan, n-Decan, n-Undecan und n-Dodecan, sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga dieser Verbindungen, wie z.B. analoge Verbindungen mit 1 bis 3 Methyl-Seitengruppen; oder die ein- oder mehrfach, beispielsweise einfach ungesättigten Analoga der oben ge-  
15 nannten Alkane.

Erfindungsgemäß oxidierbare Substrate der Gruppe d) sind gegebenenfalls substituierte Cycloalkane und Cycloalkene mit 4 bis 8 Ring-C-Atomen. Beispiele hierfür sind Cyclopentan, Cyclopenten,  
20 Cyclohexan, Cyclohexen, Cycloheptan und Cyclohepten. Die Ringstruktur kann dabei ein- oder mehrfach, wie z.B. 1 bis 5 Substituenten gemäß obiger Definition für Verbindungen der Gruppen a) und b) tragen. Nichtlimitierendes Beispiel hierfür sind Ionone, wie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ionon, sowie die entsprechenden Methylionone und  
25 Isomethylionone. Besonders bevorzugt sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine der erfindungsgemäßen Monooxygenasen. Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:1, welche wenigstens eine Nukleotidsubstitution aufweisen, die zu einer der  
30 oben beschriebenen funktionellen Aminosäuremutationen führt. Gegenstand der Erfindung sind außerdem die durch Addition, Substitution, Insertion und/oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide erhaltenen funktionalen Analoga der Nukleinsäuren, welche weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Substratspezifität, wie z. B. mit Indol-oxidierender Aktivität, kodieren.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus,  
40 im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten davon. Erfindungsgemäß umfasst sind außerdem durch Degeneration des genetischen Codes (d. h. ohne Veränderung der korrespondierenden Aminosäuresequenz) oder konservative Nukleotidsubstitution (d. h. die korrespondierende Aminosäure wird durch eine andere Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhaltene  
45 Abwandlungen der Nukleinsäuresequenzen, ebenso wie durch Nukleo-

tidaddition, -insertion, -inversion oder -deletion veränderte Sequenzen, welche für eine erfindungsgemäße Monooxygenase mit "verändertem Substratprofil" kodieren, sowie die korrespondierenden komplementären Sequenzen.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen wenigstens eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.
- 10 Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ
- 15 verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.
- 25 Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann
- 30 aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression
- 35 gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die

40 gram-positiven Promotoren amy und SP02, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P<sub>r</sub>P<sub>1</sub>-Promotor.

45

## 8

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

5 Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

10 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, 15 indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

20 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold 25 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience 30 (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale 35 Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise 40 Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikro- 45 organismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise

werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und expri-  
miert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige  
Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genann-  
5 ten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression  
zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current  
Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley  
Interscience, New York 1997, beschrieben.

10 Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet,  
die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer  
Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate er-  
möglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien,  
Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Be-  
vorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen  
15 *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus*  
oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen, wie *Saccharomy-  
ces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Tie-  
ren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

20 Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organis-  
men wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder  
transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den  
transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out  
Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endo-  
25 gene Gen ausgeschaltet wurde, wie z. B. durch Mutation oder par-  
tielle oder vollständige Deletion.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch  
Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expres-  
sionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene  
30 sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farb-  
gebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformier-  
ten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zell-  
sortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor trans-  
formierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikare-  
35 sistenzgen (z. B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch  
entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden se-  
lektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert  
werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie  
genutzt werden.

40

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen  
passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie bei-  
spielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die  
Phagen  $\lambda$ ,  $\mu$  oder andere temperente Phagen oder Transposons und/  
45 oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein  
Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expres-  
sionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen,

## 10

und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

5 Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z. B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA zu programmieren.

10

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Monooxygenase, wobei man einen Monooxygenase-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase  
15 aus der Kultur isoliert. Die erfindungsgemäße Monooxygenase könne so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

20 Der Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory  
25 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und die Monooxygenase  
30 nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder  
35 durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden. Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe  
40 Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification,  
45 Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.



Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für  
5 veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z. B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epi-  
10 tope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer  
15 Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem üb-  
20 liche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

25 Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation organischer Verbindungen, wie z. B. N-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen gemäß obiger Definition, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 30 a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium in Gegenwart eines exogenen (von außen zugesetzten) oder intermediär gebildeten von der erfindungsgemäßen Monooxygenase oxidierbaren Substrats, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff (d.h. aerob), kultiviert; oder  
35 a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem erfindungsgemäßen Enzym, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff und einem Elektronendonator, inkubiert; und  
b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

40

Der für die Umsetzung erforderliche Sauerstoff gelangt entweder aus der Umgebungsluft in das Reaktionsmedium oder kann, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise zugesetzt werden.

45 Bevorzugt ist das oxidierbare Substrat ausgewählt unter

- a) gegebenenfalls substituierten N-heterocyclischen ein-, zwei- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;

## 12

- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.

5

Eine bevorzugte Verfahrensvariante ist auf die Bildung von Indigo/Indirubin gerichtet und dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat intermediär in Kultur gebildetes Indol ist und man aus dem Kulturmedium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediär gebildete Hydroxyindolen erzeugt wurde.

15 Wird die erfindungsgemäße Oxidation mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Die Zugabe von exogenem Indol ist gewöhnlich nicht erforderlich, da dieses vom Mikroorganismus intermediär gebildet wird. Bei Um-

20 setzung anderer Substrate kann dagegen die Zugabe exogenen Substrates erforderlich sein. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren, insbesondere temperaturinduzierbaren, Promotors. Man erhöht dabei die Temperatur auf die erforderliche Induktionstemperatur, z.B.

25 42 °C beim  $P_rP_l$ -Promotor, behält dies über einen ausreichenden Zeitraum, z. B. 1 bis 10 oder 5 bis 6 Stunden, zur Expression der Monooxygenase-Aktivität bei und verringert anschließend der Temperatur wieder einen Wert von etwa 30 bis 40 °C. Die Kultivierung wird dann in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fort-

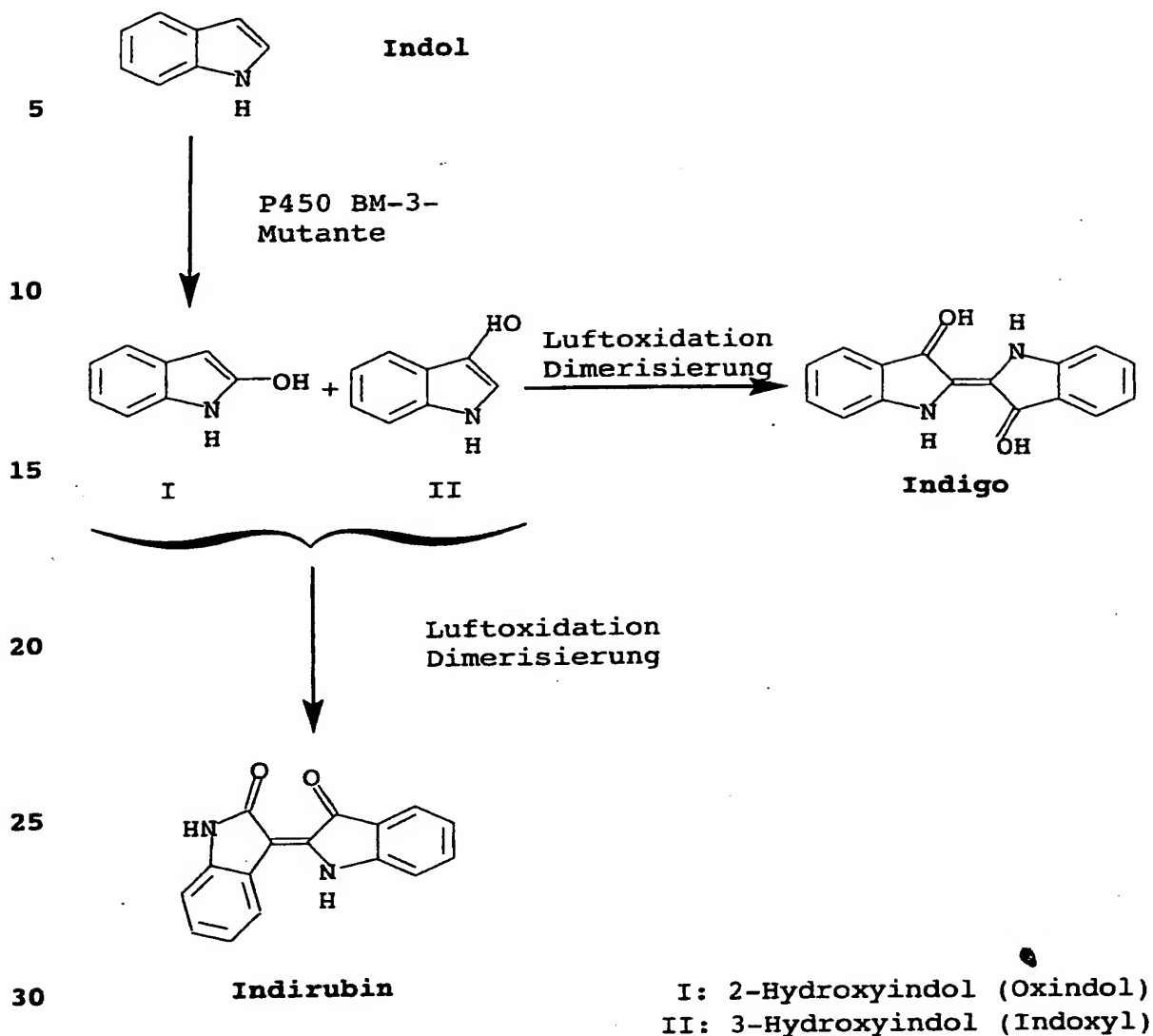
30 gesetzt. Insbesondere bei Indol-Oxidation kann der pH-Wert durch Zugabe von NaOH, z.B. auf 9 bis 10, erhöht werden, wodurch die Indigobildung bzw. Indirubinbildung durch Luftoxidation der enzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte 2- und 3-Hydroxyindol zusätzlich gefördert wird.

35

Die erfindungsgemäße Indigo/Indirubin-Bildung wird durch folgendes Reaktionsschema veranschaulicht:

40

45



35

Wird die erfindungsgemäße Oxidation dagegen mit gereinigten oder angereicherten Enzymmutanten durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem exogenes Substrat enthaltenden, wie z.B. Indol enthaltenden, Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50 °C, wie z.B. 30 bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 1- bis 100-fachen oder 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktions-

40

45

## 14

mittel ist NADPH. Die Zugabe des Reduktionsmittels kann falls erforderlich portionsweise erfolgen.

5 In analoger Weise werden als oxidierbare Substrate bevorzugt eingesetzt: n-Hexan, n-Octan, n-Decan, n-Dodecan, Cumol, 1-Methylindol, 5-Cl- oder Br-Indol, Inden, Benzothiophen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ionenon, Acridin, Naphthalin, 6-Methyl- oder 8-Methylchinolin, Chinolin und Chinaldin.

10 Beispielsweise kann die erfindungsgemäße enzymatische Oxidationsreaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt werden:

Substratkonzentration: 0,01 bis 20 mM

Enzymkonzentration: 0,1 bis 10 mg/ml

15 Reaktionstemperatur: 10 bis 50 °C

pH: 6 bis 8

Puffer: 0,05 bis 0,2 M Kaliumphosphat, oder Tris/

20 HCl

Elektronendonator: wird bevorzugt portionsweise zugegeben (Anfangskonzentration etwa 0,1 bis 2 mg/ml)

25

Vor dem Start der Reaktion, z.B. durch Zugabe der Elektronendonors (z.B. NADPH) kann kurzzeitig (1 bis 5 Minuten) vorinkubiert werden (bei etwa 20 bis 40 °C). Die Umsetzung erfolgt aerob, gegebenenfalls bei zusätzlicher Einleitung von Sauerstoff.

30

Beim erfindungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

35

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z.B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

40 Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Bioreaktoren, umfassend ein erfindungsgemäßes Enzym oder einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in immobilisierter Form.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase oder eines erfindungsgemäßen Vektors oder Mikroorganismus zur mikrobiologischen Oxidation eines Substrates aus einer der Gruppen a) bis d), insbesondere N-heterocyclischer ein-, zwei- oder mehrkerniger ar-

45

## 15

motischer Verbindungen, und bevorzugt zur Bildung von Indigo und/oder Indirubin.

Die vorliegende Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1:

Randomisierung spezieller Codons von P450 BM-3

Die Versuche wurden im wesentlichen wie beschrieben in (19) durchgeführt. Drei Positionen (Phe87, Leu188 und Ala74) wurden mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese unter Verwendung des Stratagene QuikChange kit (La Jolla, CA, USA) randomisiert. Folgende PCR-Primer wurden für die einzelnen Positionen verwendet:

- 15 Phe87: 5'-gcaggagacgggttgnnnacaagctggacg-3' (SEQ ID NO:3),  
 5'-cgtccagcttgtnnncaaccgctctcctgc-3', (SEQ ID NO:4)  
 Leu188: 5'-gaagcaatgaacaagnnnncagcgagcaaatccag-3' (SEQ ID NO:5),  
 5'-ctggatttgctcgctgnnncttgttcattgcttc-3' (SEQ ID NO:6);  
 Ala74: 5'-gctttgataaaaacttaaagtcaannncttaaatttgtacg-3'  
 (SEQ ID No:7),  
 20 5'-cgtacaaatttaagnnnnttgacttaaggttttatcaaagc-3'  
 (SEQ ID NO:8)

Die Bedingungen für die PCR waren für alle drei Positionen identisch. Insbesondere wurden je 50 µl Reaktionsvolumen 17,5 pmol eines jeden Primers, 20 pmol Template-Plasmid-DNA, 3 U der Pfu Polymerase und 3,25 nmol von jedem dNTP verwendet. Die PCR Reaktion wurde bei 94°C /1 min gestartet und dann wurde folgender Temperaturzyklus 20 mal durchgeführt: 94°C, 1 min; 46°C, 2,5 min; 72°C, 17 min. Nach 20 Zyklen wurde die Reaktion 15 min bei 72°C fortgesetzt. Nach der PCR wurde die Template DNA mit 20 U DpnI bei 37°C 3 h verdaut. Anschließend wurde E. coli DH5α transformiert. Die transformierten E. coli DH5α-Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 150 µg/ml Ampicillin enthielten. Anschließend wurde 18 h bei 37°C inkubiert.

Beispiel 2:

Expression und Reinigung der P450 BM-3 und dessen Mutanten und Produktion eines blauen Pigmentes

Das P450 BM-3-Gen und die Mutanten davon wurden unter der Kontrolle des starken, Temperatur-induzierbaren  $P_{RPL}$ -Promotors des Plasmids pCYTEXP1 in E. coli DH5α wie bereits beschrieben (20), exprimiert. Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, enthaltend je Vertiefung 200 µl TB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin transferiert. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. 40 µl der Zellkultur einer jeden Vertiefung wurden anschließend in ein Kultur-

## 16

röhrchen überführt, das 2 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthält. Anschließend wurde 2 h bei 37°C kultiviert. Dann wurde die Tempertur zur Induktion 6 h auf 42°C erhöht. Dann wurde die Kultivierung über Nacht bei 37°C fortgesetzt, wobei ein blaues  
5 Pigment produziert wurde.

Die präparative Herstellung von Enzym oder blauem Pigment wurde ausgehend von einer 300 ml Zellkultur ( $OD_{578nm} = 0,8$  bis 1,0) durchgeführt. Zur Isolierung des Enzymes wurden die Zellen 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, in 0,1 M  $K_xPO_4$ -Puffer, pH 7,4 resuspendiert. Die eisgekühlten Zellen wurden mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Deutschland) bei einer Energieoutput von 80 W durch dreimalige Beschallung von 2 min vorsichtig aufgeschlossen. Die Suspensionen wurden 20 min bei 32570 x g zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde zur Aktivitätsbestimmung bzw. zur Enzymreinigung eingesetzt. Die Enzymreinigung erfolgte wie in (21)  
15 bereits beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Extinktionsdifferenz bei 450 und 490 nm, wie in (11) bereits beschrieben, unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von  
20  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

## Beispiel 3:

Isolierung von Mutanten, welche große Mengen an blauem Pigment  
25 produzieren

Jeweils 100 Kolonien wurden von den Mutanten einer jeden Position isoliert, welche durch randomisierte Mutagenese des Codons der entsprechenden Position erzeugt wurden. Diese Kolonien wurden in Kulturröhrchen zur Produktion von blauem Pigment kultiviert. Nach  
30 dem Waschen der Zellen mit Wasser und mehreren langsamen Zentrifugationsschritten (500 Upm) wurde das blaue Pigment mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert. Die Löslichkeit des blauen Pigmentes war in DMSO am größten. Die Absorption des Extraktes wurde bei 677 nm bestimmt. Diejenige Mutante, welche die größte Menge  
35 an blauem Pigment von allen Mutanten einer bestimmten Position produzierte, wurde für eine DNA-Sequenzierung (ABI DNA Sequenzierungs-Kit; ABI Prism™ 377 DNA Sequencer) verwendet und außerdem als Template für ortsspezifische randomisierte Mutagenese verwendet.

## 40 Beispiel 4:

Aktivitätstest für die Indol-Hydroxylierung

Die Indol-Hydroxylierungsaktivität wurde in einer Lösung getestet, die 8 µl einer 10-500 mM Indollösung in DMSO, 850 µl Tris/  
45 HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,6 nmol P450 BM-3 Wildtyp oder Mutante in einem Endvolumen von 1 ml enthielt. Das Gemisch wurde 9 min vorinkubiert, bevor man die Reaktion durch Zugabe von 50 µl

## 17

einer wässrigen 1 mM Lösung von NADPH startete. Die Reaktion wurde nach 20 sec durch Zugabe von 60 µl 1,2 M KOH gestoppt. Innerhalb von 5 bis 30 sec (unter aeroben Bedingungen) wurden die Enzymprodukte vollständig in Indigo [ $\Delta^{2,2'}$ -Biindolin]-3,3'-dion) und Indirubin ([ $\Delta^{2,3'}$ -Biindolin]-2',3-dion) überführt. Die Indigo-  
5 produktion wurde über dessen Absorption bei 670 nm bestimmt. Eine Eichkurve mit reinem Indigo zeigte einen Extinktionskoeffizienten von 3,9 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei dieser Wellenlänge. Ein linearer Kurvenverlauf wurde für die Indigoproduktion in einer Reaktionszeit von 40  
10 sec unter Verwendung von 0,6 nmol Wildtyp bzw. P450 BM-3-Mutante und 0,05 bis 5,0 mM Indol erhalten. Indirubin zeigt eine sehr schwache Absorption bei 670 nm und die gebildete Indirubinmenge war sehr viel geringer als die gebildete Indigomenge. Die Bildung von Indirubin wurde bei der Bestimmung der kinetischen Parameter vernachlässigt. Der NADPH-Verbrauch wurde bei 340 nm bestimmt und  
15 unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von 6,2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> wie beschrieben (17) berechnet.

## Beispiel 5:

## 20 Reinigung von Indigo und Indirubin

Nach Waschen der Zellen mit Wasser und wiederholter Zentrifugation bei 500 g wurde das gebildete blaue Pellet mit Tetrahydrofuran (THF) extrahiert. Der Extrakt wurde bis fast zur Trockene  
25 eingedampft und das rote Pigment wurde mehrmals mit 50 ml absolutem Ethanol extrahiert. Der verbleibende blaue Feststoff wurde in THF gelöst und durch Dünnschichtchromatographie (TLC) analysiert. Die Ethanollösung wurde eingedampft und durch Silicagelchromatographie (DC 60, Merck, Darmstadt, Deutschland; 2 cm x 30 cm)  
30 gereinigt, bevor sie mit THF und Petrolether in einem Verhältnis von 1:2 gewaschen wurde. Die erhaltene rote Lösung wurde eingedampft und deren Reinheit wurde durch TLC bestimmt. Die Absorptionsspektren des blauen und des roten Pigmentes wurden mit Hilfe eines Ultraspec 3000 Spektrophotometers (Pharmacia, Uppsala, Swe-  
35 den) in einem Bereich von 400 bis 800 nm bestimmt. Außerdem wurde der blaue und der rote Farbstoff durch Massenspektrometrie und <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie analysiert.

## Versuchsergebnisse

## 40 1. Erhöhung der Produktivität für blaues Pigment durch P450 BM-3-Mutagenese

Natives P450 BM-3 besitzt nicht die Fähigkeit zur Produktion des blauen Indigo-enthaltenden Pigments, bzw. der Vorläufersubstanten  
45 2- bzw 3-Hydroxyindol. Um eine ausreichende Menge an blauem Pigment herstellen zu können, wurde P450 BM3 einer gezielten Evolution ausgesetzt. Sämtliche Mutanten, welche das blaue Pigment

produzierten, wurden sequenziert. Es wurde festgestellt, daß wenigstens eine der folgenden drei Positionen mutiert waren: Phe87, Leu188 und Ala74. Es wurde deshalb angenommen, daß diese drei Positionen eine entscheidende Rolle für die Aktivität von P450 BM-3 bei der Produktion von blauem Pigment spielen. Aus der Struktur der Häm-Domäne von Cytochrom-P450-BM 3, komplexiert mit Palmitoleinsäure sieht man, daß Phe87 das Substrat an einem näheren Heranrücken an die Häm-Gruppe hindert (14). Die Mutante Phe87Val zeigt eine hohe Regio- und Stereoselektivität bei der Epoxidation von (14S, 15R)-Arachidonsäure (13) und die Mutante Phe87Ala verschiebt die Hydroxylierungsposition von  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 und  $\omega$ -3 zu (22). Die Position 87 wurde deshalb als erste für die ortsspezifische randomisierte Mutagenese mit Hilfe von PCR ausgewählt. In Röhrchenkulturen wurden 7 Kolonien erhalten, welche eine geringe Menge an blauem Pigment nach Induktion produzierten. Die Kolonie, welche die größte Menge des blauen Pigments produzierte, wurde für die DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten ergaben eine Substitution von Phe87 durch Val. Die Mutante Phe87Val wurde anschließend als Template für die zweite Runde der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese an Position Leu188 verwendet. Die Struktur der Häm-Domäne, komplexiert mit Palmitoleinsäure zeigt, daß die Repositionierung der F- und G-Helices den Rest Leu188 in direkten Kontakt mit dem Substrat bringt (14). Diese Position könnte deshalb eine wichtige Rolle bei der Substratbindung oder -orientierung spielen. Nach dem zweiten Screeningdurchgang wurden 31 Kolonien beobachtet, welche das blaue Pigment produzierten. Die Mutante, welche die größte Pigmentmenge produzierte, enthielt die Substitutionen Phe87Val und Leu188Gln. Diese Mutante wurde anschließend in Position Ala74 im dritten Durchgang der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese mutiert. Man erhielt dabei die Dreifachmutante F87L188A74 (Phe87Val, Leu188Gln und Ala74Gly), welche mehrere mg blaues Pigment in einem 2-Liter-Kolben, enthaltend 300 ml TB-Medium, produzierte. Diese Menge reichte zur Isolierung und Charakterisierung des blauen Pigmentes aus.

## 2. Isolierung und Identifizierung des blauen Pigments

Nach dem Auswaschen der Zellen wurde das verbleibende blaue Pellet mit THF extrahiert und TLC analysiert. Das blaue Pigment wurde in eine schneller wandernde blaue Komponente und in eine langsamer wandernde rote Komponente aufgetrennt. Beide Komponenten zeigten exakt die gleichen Mobilitätsparameter wie die Komponenten einer kommerziellen Indigo-Probe.

Nach der Reinigung wurden die Absorptionsspektren beider Komponenten in DMSO bestimmt. Die blaue Komponente zeigte das gleiche Spektrum wie eine kommerzielle Indigoprobe. Die gereinigte blaue und rote Komponente wurden jeweils durch Massenspektrometrie ana-



lysiert. Die Massenspektren beider Pigmente zeigten einen starken Molekülionenpeak bei  $m/z = 262$  und zwei Fragmentationenpeaks bei  $m/z = 234$  und  $205$  (relative Intensität jeweils 10%). Dieses Muster ist typisch für indigoide Verbindungen. Die Elementarzusammensetzung dieser Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt als  $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ,  $C_{15}H_{10}N_2O$  bzw.  $C_{14}H_9N_2$ . Dies ist ebenfalls charakteristisch für Strukturen vom Indigotyp. Das blaue Pigment wurde somit als Indigo und das rote Pigment als Indirubin bestimmt. Zur Bestätigung der Struktur wurden 500 MHz  $^1H$ -NMR-Spektren beider Pigmente in DMSO- $D_6$ -Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit den Literaturangaben (23) überein.

### 3. Produktion von Indigo mit isolierten Enzymen

Es ist bekannt, daß Indigo aus Indol durch mikrobielle Transformation zugänglich ist (24-26). Keines dieser mikrobiellen Systeme enthielt jedoch eine P450 Monooxygenase. Erfindungsgemäß wurde zunächst die katalytische Aktivität des reinen Enzyms für Indol bestimmt. Die Mutante F87L188A74 wurde mit Indol vermischt. Keine Farbreaktion war zu beobachten. Erst nach Zugabe von NADPH zum Reaktionsgemisch bildete sich das blaue Pigment nach etwa 20 min. Durch Einstellung des pH-Werts der Reaktionsmischung auf einen Wert von etwa 11, 30 sec nach Zugabe von NADPH, wurde die blaue Färbung innerhalb von wenigen Sekunden sichtbar. Kontrollversuche unter Verwendung von nativem P450 BM-3 waren immer negativ, selbst unter Verwendung erhöhter Konzentrationen an Enzym, Indol und NADPH. Das blaue Pigment wurde mit Ethylacetat extrahiert und durch TLC analysiert. Das blaue Pigment trennte sich wieder in eine schneller laufende blaue Komponente und in eine langsamer laufende rote Komponente auf. Die  $R_f$ -Werte und die Absorptionsspektren waren identisch mit denjenigen Werten der Extrakte aus der Fermentationsbrühe. Die F87L188A74-Mutante von P450 BM-3 stellt somit eine Indolhydroxylase dar.

Es sind bisher zwei Wege für die enzymatische Transformation von Indol zu Indigo beschrieben worden. Ein Weg wird durch eine Dioxygenase, der andere durch eine Styrolmonooxygenase katalysiert (24,25). Die NADPH-Stöchiometrie beträgt in beiden Fällen 2. Es wurde deshalb angenommen, daß im Gegensatz zu den Dioxygenasen die erfindungsgemäße Mutante F87L188A74 Indol in nur einer Position hydroxyliert, um Oxindol (2-Hydroxyindol) oder Indoxyl (3-Hydroxyindol) zu bilden.

### 4. Kinetische Parameter der Indolhydroxylierung

Reine Proben des Wildtyp-Enzyms P450 BM-3 und der Mutanten Leu188Gln, Phe87Val, F87L188 und F87L188A74 wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Indolhydroxylierung verwendet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1 zusammengefaßt.

## 20

Tabelle 1: Kinetische Parameter der P450 BM-3 Mutanten für Indolhydroxylierung

Mutanten	$K_{cat}(S^{-1})$	$K_m(mM)$	$K_{cat}/K_m(M^{-1}s^{-1})$
5 WT	-a)	-	-
Leu188Gln	n.d.b)	n.d.	n.d.
Phe87Val	2,03 (0,14)	17,0 (1,0)	119
F87L188	2,28 (0,16)	4,2 (0,4)	543
10 F87L188A74	2,73 (0,16)	2,0 (0,2)	1365

a) keine Aktivität wurde beobachtet;

b) nicht bestimmt (Aktivität war zu gering um gemessen zu werden)

- 15 Selbst beim Überschuß an gereinigtem Enzym und hoher Indolkonzentration ist das Wildtyp-Enzym nicht in der Lage, Indol zu oxidieren. Die Mutante Leu188Gln zeigt eine geringe Aktivität. Die Mutante Phe87Val zeigt eine katalytische Wirksamkeit von 119  $M^{-1}s^{-1}$  für die Indolhydroxylierung. Die katalytische Effizienz der Doppelmutante F87L188 (Phe87Val, Leu188Gln) erhöhte sich auf 543  $M^{-1}s^{-1}$  und wurde durch Einführung der weiteren Substitution Ala74Gly auf 1365  $M^{-1}s^{-1}$  erhöht. Die  $K_{cat}$ -Werte erhöhten sich von Phe87Val zur Dreifachmutante hin um insgesamt 35%, während die  $K_m$ -Werte etwa um das Siebenfache abnahmen. Dies weist darauf hin, 25 daß Ala74Gly und Leu188Gln vorwiegend an der Substratbindung beteiligt sind.

Die Indol-Turnover-Rate ( $K_{cat}=2,73 s^{-1}$ ) war für die Dreifachmutante F87L188A74 mehr als zehnfach höher als für die meisten P450-Enzyme (18).

30

Beispiel 6:

n-Oktanhydroxylierung mit modifizierter Cytochrom P450 Monooxygenase

- 35 Die Umsetzungen wurden mit einer P450 BM-3-Monooxygenase Mutante durchgeführt, die folgende Mutationen enthält: Phe87Val Leu188Gln Ala74Gly

- Als Substrat wurde n-Octan gewählt. Für die Hydroxylierung des 40 n-Octans wurde folgender aerober Reaktionsansatz verwendet:

P450 BM-3 Mutante: 17,5 mg (Lyophilisat)  
 Reaktionspuffer: 9,1 ml (Kaliumphosphat-Puffer 50 mM, pH 7.5)  
 Substrat: 50  $\mu$ l einer 60 mM Lösung (in Aceton)  
 45 Temperatur: 25°C

## 21

Enzymlyophilisat wurde in 500 µl Reaktionspuffer gelöst und zunächst mit Substrat und Reaktionspuffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl NADPH-Lösung (5mg/ml). Die NADPH Zugabe wurde noch zweimal wiederholt. 5 Der Reaktionsverlauf wurde durch Absorptionsmessungen bei 340 nm verfolgt, wobei die NADPH Abnahme beobachtet werden kann. NADPH wird dabei in 300 µl-Schritten zugegeben, da eine zu hohe Konzentration an NADPH in der Reaktionslösung zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Zur Isolierung der Produkte wurde anschließend 10 die Reaktionslösung 3 mal mit 5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Anschließend wurden die Produkte über DC, GC/MS und NMR charakterisiert.

Die GC/MS Analyse des Reaktionsgemisches führte zu folgendem Ergebnis: 15

20 Verbindung	Rt[min] <sup>1)</sup>	Umsatz [%]
4-Octanol	13.51	37
3-Octanol	14.08	47
2-Octanol	14.26	16

25 1) Temperaturprogramm: 40°C 1 min isotherm / 3°C/min 95°C / 10°C/min 275°C; Apparatur: Finnigan MAT 95; GC: HP 5890 Series II Split Injector; Säule: HP-5MS (Methylsiloxan) 30m x 0.25mm; Trägergas: 0,065 ml/min He

30 Edukt wurde nicht mehr gefunden.

## Beispiel 7:

Hydroxylierung von Aromaten, Heteroaromaten und Trimethylcyclohexenylverbindungen 35

a) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Octan als Substrat Naphthalin eingesetzt wurde. Als Produkte wurden 1-Naphthol und cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin identifiziert. Vom eingesetzten Naphthalin wurden 88% umgesetzt. 40

Analytik für Umsetzungen mit Naphthalin

GC:

45 Apparatur: Carlo Erba Strumentazione Typ HRGC 4160 on Column Injector; Säule: DB5 30m x 0,2 mm; Material: 5% Diphenyl- 95% Dimethylpolysiloxan; Trägergas: 0,5 bar H<sub>2</sub>;

## 22

Temperaturprogramm: 40°C 1 min isotherm / 10°C/min bis 300°C  
Rt(1-Naphthol) = 16.68

NMR:

5 Im <sup>1</sup>H-NMR konnte 1-Naphthol und cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin identifiziert werden.

10 b) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Ok-tan als Substrat 8-Methylchinolin eingesetzt wurde. Als Hauptprodukt wurde 5-Hydroxy-8-methylchinolin neben weiteren Derivaten (Produktverhältnis 5:1) identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 35% umgesetzt.

15 c) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Ok-tan als Substrat α-Ionon eingesetzt wurde. Als Hauptprodukt wurde 3-Hydroxy-α-ionon neben weiteren Derivaten (Produktverhältnis 76:24) identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 60% umgesetzt.

20 d) Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei jedoch anstelle von n-Ok-tan als Substrat Cumol (i-Propylbenzol) eingesetzt wurde. Es wurden fünf Monohydroxyprodukte und ein Dihydroxyprodukt identifiziert. Vom eingesetzten Edukt wurden 70% umgesetzt.

25

30

35

40

45

## LITERATUR

1. Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. USA 95,5511-5515.
- 5 2. Zhang, J.-H., Dawes, G., and Stemmer, W. P. C. (1997) Proc. Natl. Acad Sci. USA 94, 4504-4509.
- 10 3. Wan, L., Twitchett, M. B., Eltis, L. D., Mauk, A. G., and Smith, M. (1998) Proc. Natl. Acad Sci USA 95,12825-12831.
4. Cronin, C. N. (1998) J. Biol. Chem 273,24465-24469.
- 15 5. Wilks, H. M., Hart, K- W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R., Holbrook, I J. (1988) Science 242, 1541-1544.
6. Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W. J. (1992) Science 255, 1249-1253.
- 20 7. Tucker, C. L., Hurley, J. H., Miller, T. R., and Hurley, I B. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. USA 95, 5993-5997.
- 25 8. Quemeneur, E., Moutiez, J.-B. C., and Menez, A. (1998) Nature (London) 391, 301-303.
9. Marsden, A- F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, I Leadlay, P. F. (1998) Science 279, 199-201.
- 30 10. Chen, R., Greer, A., and Dean, A. M. (1998) Proc. Natl. Acad Sci. US4 95, 11666-11670.
11. Boddupalli, S. S., Estabrook, R. W. and Peterson, J. A. (1990) J Biol. Chem 265, 4233-4239.
- 35 12. Capdevila, J. H., Wie, S., Helvig, C., Falck, J. R., Belosludtsev, Y.,Truan, G., Graham-Lorence, S. E., and Peterson, J. A. (1996) J. Biol. Chem 271, 22663-22671.
- 40 13. Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J. A., Flack, J. R., WeL S., Helvig, C., Capdevilla, J. H. (1997) J. Biol. Chem 272,1127-1135.
- 45 14. Li, H., Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol., 4, 140-146.

## 24

15. Ravichandran, K G., Sekhar, S., Boddupalli, S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, I (1993) Science 261,731-736.
- 5 16. Modi S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L.- Y., Roberts, G. C. K (1996) Nat. Structural Biol. 3, 414-417.
17. Oliver, C.F., Modi S., Primrose, W.U., Lian, L.Y. and Roberts, G.C.K (1997) Biochem. J 327,537-544.
- 10 18. Guengerich, F.G. (1991) J. Biol. Chem 266,10019-10022.
19. Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A-, Jones, A., and Pedersen, A. H. (1999) Nature Biotechnology 17, 379-384.
- 15 20. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. (1999) Anal Biochem. 269,359-366.
- 20 21. Schwaneberg, U, Sprauer, AL, Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. J of Chromatogr. A, in press.
22. Oliver, C.F., Modi, S., Sutcliffe, M.J., Primrose, W.U., Lian, L.Y. and Roberts, G.C.K (1997) Biochemistry 36, 1567-1572.
- 25 23. Hart, S., Koch, KR., and Woods, D.R. (1992) J Gen. Microbiol. 138,211-216
- 30 24. Murdock, D., Ensley, B.D., Serdar, C. and Thalen, M. (1993) Bio/Technology 11, 381-385.
25. O'Connor, ICE., Dobson, A-W. and Hartmans, S. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63, 4287-4291.
- 35 26. Eaton, R. W. and Chapman, P. J. (1995) J Bacteriol. 177, 6983-6988.

40

45

## Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, welche zu wenigstens einer der  
5 folgenden Reaktionen befähigt ist:
- a) Oxidation gegebenenfalls substituierter N-, O- oder S-he-  
terocyclischer ein- oder mehrkerniger aromatischer Verbin-  
dungen;
  - 10 b) Oxidation gegebenenfalls substituierter ein- oder mehr-  
kerniger Aromaten;
  - c) Oxidation geradkettiger oder verzweigter Alkane und Al-  
kene;
  - 15 d) Oxidation gegebenenfalls substituierter Cycloalkane und  
Cycloalkene
2. Monooxygenase nach Anspruch 1, abgeleitet von Cytochrom P450  
Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
- 20 3. Monooxygenase nach Anspruch 2, abgeleitet von Cytochrom P450  
Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Amino-  
säuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funk-  
tionelle Mutation in wenigstens einem der Aminosäuresequenz-  
bereiche 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335, 352-356,  
25 73-82 und 86-88 aufweist.
4. Monooxygenase nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass  
sie wenigstens eine funktionelle Mutation in wenigstens einem  
der Sequenzbereiche 73-82, 86-88 und 172-224 aufweist.
- 30 5. Monooxygenase nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass  
sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Amino-  
säuresubstitutionen aufweist:
- 35 a) Phe87Val;
  - b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
  - c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;
- sowie funktionale Äquivalente davon.
- 40 6. Nukleinsäuresequenz, kodierend für eine Monooxygenase nach  
einem der vorherigen Ansprüche.

7. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 6 umfasst.
- 5 8. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt nach Anspruch 7.
- 10 9. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 8.
10. Mikroorganismus nach Anspruch 9, ausgewählt unter Bakterien der Gattung Escherichia.
- 15 11. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation einer Verbindung gemäß der Definition von Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 20 a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 in einem Kulturmedium, in Gegenwart eines exogenen oder intermediär gebildeten Substrats, kultiviert; oder
- a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 inkubiert; und
- 25 b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene oder intermediär gebildete Substrat ausgewählt ist unter
- 30 a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
- b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
- 35 c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen;
- d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkenen.
- 40 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat intermediär gebildetes Indol ist und man aus dem Medium das anfallende Indigo und/oder Indirubin isoliert, welches durch Oxidation von intermediär gebildetem Indol erzeugt wurde.
- 45 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man die Indoloxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur



von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.

15. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man  
5 als exogenes Substrat wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter den oben definierten Gruppen a) bis d) von Verbindungen, einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltigen Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa  
10 10- bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.
- 15 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man als exogenes Substrat eine Verbindung, ausgewählt unter Indol, n-Hexan, n-Octan, n-Decan, n-Dodecan, Cumol, 1-Methylindol, 5-Cl- oder Br-Indol, Inden, Benzothiophen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ionon, Acridin, Naphthalin, 6-Methyl- oder 8-Methylchinolin, Chinolin und Chinaldin, einsetzt.  
20
17. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10 in immobilisierter Form.  
25
18. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Vektors nach Anspruch 8, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 zur mikrobiologischen Oxidation von  
30
- a) gegebenenfalls substituierten N-, O- oder S-heterocyclischen ein- oder mehrkernigen aromatischen Verbindungen;
  - b) gegebenenfalls substituierten ein- oder mehrkernigen Aromaten;
  - 35 c) geradkettigen oder verzweigten Alkanen und Alkenen; und/oder
  - d) gegebenenfalls substituierten Cycloalkanen und Cycloalkanen.
- 40 19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Herstellung von Indigo und/oder Indirubin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

WO 01/07630

PCT/EP00/07253

-1-

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

<120> Neue Cytochrom P450 Monooxygenasen und deren Verwendung zur  
Oxidation von organischen Substraten

&lt;130&gt; M/40241

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3150

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus megaterium

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (4)..(3150)

&lt;400&gt; 1

atg	aca	att	aaa	gaa	atg	cct	cag	cca	aaa	acg	ttt	gga	gag	ctt	aaa	48
Thr	Ile	Lys	Glu	Met	Pro	Gln	Pro	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Leu	Lys		
1				5				10						15		

aat	tta	ccg	tta	tta	aac	aca	gat	aaa	ccg	gtt	caa	gct	ttg	atg	aaa	96
Asn	Leu	Pro	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Lys	Pro	Val	Gln	Ala	Leu	Met	Lys	
			20					25						30		

att	gcg	gat	gaa	tta	gga	gaa	atc	ttt	aaa	ttc	gag	gcg	cct	ggt	cgt	144
Ile	Ala	Asp	Glu	Leu	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Phe	Glu	Ala	Pro	Gly	Arg	
			35					40						45		

gta	acg	cgc	tac	tta	tca	agt	cag	cgt	cta	att	aaa	gaa	gca	tgc	gat	192
Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ser	Gln	Arg	Leu	Ile	Lys	Glu	Ala	Cys	Asp	
			50				55					60				

gaa	tca	cgc	ttt	gat	aaa	aac	tta	agt	caa	gcg	ctt	aaa	ttt	gta	cgt	240
Glu	Ser	Arg	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Ser	Gln	Ala	Leu	Lys	Phe	Val	Arg	
			65				70					75				

gat	ttt	gca	gga	gac	ggg	tta	ttt	aca	agc	tgg	acg	cat	gaa	aaa	aat	288
Asp	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Leu	Phe	Thr	Ser	Trp	Thr	His	Glu	Lys	Asn	
			80			85				90						95

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-3-

agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac	960
Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn	
305 310 315	
gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca	1008
Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala	
320 325 330 335	
aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac	1056
Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp	
340 345 350	
gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg	1104
Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp	
355 360 365	
gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt	1152
Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser	
370 375 380	
gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg	1200
Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala	
385 390 395	
tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt	1248
Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly	
400 405 410 415	
atg atg cta aaa cac ttt gac ttt gaa gat cat aca aac tac gag ctg	1296
Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu	
420 425 430	
gat att aaa gaa act tta acg tta aaa cct gaa ggc ttt gtg gta aaa	1344
Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys	
435 440 445	
gca aaa tcg aaa aaa att ccg ctt ggc ggt att cct tca cct agc act	1392
Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr	
450 455 460	
gaa cag tct gct aaa aaa gta cgc aaa aag gca gaa aac gct cat aat	1440
Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn	
465 470 475	
acg ccg ctg ctt gtg cta tac ggt tca aat atg gga aca gct gaa gga	1488
Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly	
480 485 490 495	
acg gcg cgt gat tta gca gat att gca atg agc aaa gga ttt gca ccg	1536
Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro	
500 505 510	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



-4-

cag gtc gca acg ctt gat tca cac gcc gga aat ctt ccg cgc gaa gga	1584
Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly	
515 520 525	
gct gta tta att gta acg gcg tct tat aac ggt cat ccg cct gat aac	1632
Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn	
530 535 540	
gca aag caa ttt gtc gac tgg tta gac caa gcg tct gct gat gaa gta	1680
Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val	
545 550 555	
aaa ggc gtt cgc tac tcc gta ttt gga tgc ggc gat aaa aac tgg gct	1728
Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala	
560 565 570 575	
act acg tat caa aaa gtg cct gct ttt atc gat gaa acg ctt gcc gct	1776
Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala	
580 585 590	
aaa ggg gca gaa aac atc gct gac cgc ggt gaa gca gat gca agc gac	1824
Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp	
595 600 605	
gac ttt gaa ggc aca tat gaa gaa tgg cgt gaa cat atg tgg agt gac	1872
Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp	
610 615 620	
gta gca gcc tac ttt aac ctc gac att gaa aac agt gaa gat aat aaa	1920
Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys	
625 630 635	
tct act ctt tca ctt caa ttt gtc gac agc gcc gcg gat atg ccg ctt	1968
Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu	
640 645 650 655	
gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa	2016
Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu	
660 665 670	
ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa	2064
Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu	
675 680 685	
ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att	2112
Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile	
690 695 700	
cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc	2160
Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly	
705 710 715	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cta	gat	gca	tca	cag	caa	atc	cgt	ctg	gaa	gca	gaa	gaa	gaa	aaa	tta	2208
Leu	Asp	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	
720					725					730					735	
gct	cat	ttg	cca	ctc	gct	aaa	aca	gta	tcc	gta	gaa	gag	ctt	ctg	caa	2256
Ala	His	Leu	Pro	Leu	Ala	Lys	Thr	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Gln	
				740					745					750		
tac	gtg	gag	ctt	caa	gat	cct	gtt	acg	cgc	acg	cag	ctt	cgc	gca	atg	2304
Tyr	Val	Glu	Leu	Gln	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Thr	Gln	Leu	Arg	Ala	Met	
			755					760					765			
gct	gct	aaa	acg	gtc	tgc	ccg	ccg	cat	aaa	gta	gag	ctt	gaa	gcc	ttg	2352
Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	His	Lys	Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	
		770						775				780				
ctt	gaa	aag	caa	gcc	tac	aaa	gaa	caa	gtg	ctg	gca	aaa	cgt	tta	aca	2400
Leu	Glu	Lys	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Ala	Lys	Arg	Leu	Thr	
	785					790					795					
atg	ctt	gaa	ctg	ctt	gaa	aaa	tac	ccg	gcg	tgt	gaa	atg	aaa	ttc	agc	2448
Met	Leu	Glu	Leu	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Ala	Cys	Glu	Met	Lys	Phe	Ser	
800					805					810					815	
gaa	ttt	atc	gcc	ctt	ctg	cca	agc	ata	cgc	ccg	cgc	tat	tac	tcg	att	2496
Glu	Phe	Ile	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ile	
			820						825					830		
tct	tca	tca	cct	cgt	gtc	gat	gaa	aaa	caa	gca	agc	atc	acg	gtc	agc	2544
Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Asp	Glu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	
			835					840					845			
gtt	gtc	tca	gga	gaa	gcg	tgg	agc	gga	tat	gga	gaa	tat	aaa	gga	att	2592
Val	Val	Ser	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Lys	Gly	Ile	
		850					855					860				
gcg	tcg	aac	tat	ctt	gcc	gag	ctg	caa	gaa	gga	gat	acg	att	acg	tgc	2640
Ala	Ser	Asn	Tyr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Cys	
	865					870					875					
ttt	att	tcc	aca	ccg	cag	tca	gaa	ttt	acg	ctg	cca	aaa	gac	cct	gaa	2688
Phe	Ile	Ser	Thr	Pro	Gln	Ser	Glu	Phe	Thr	Leu	Pro	Lys	Asp	Pro	Glu	
880					885					890					895	
acg	ccg	ctt	atc	atg	gtc	gga	ccg	gga	aca	ggc	gtc	gcg	ccg	ttt	aga	2736
Thr	Pro	Leu	Ile	Met	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Pro	Phe	Arg	
				900					905					910		
ggc	ttt	gtg	cag	gcg	cgc	aaa	cag	cta	aaa	gaa	caa	gga	cag	tca	ctt	2784
Gly	Phe	Val	Gln	Ala	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu	
			915					920								

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-6-

gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat 2832  
Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr  
930 935 940

ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg 2880  
Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr  
945 950 955

ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt 2928  
Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val  
960 965 970 975

cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat 2976  
Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp  
980 985 990

caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct 3024  
Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro  
995 1000 1005

gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg 3072  
Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val  
1010 1015 1020

agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc 3120  
Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly  
1025 1030 1035

cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa  
Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
1040 1045 3150

**<210> 2**

**<211> 1048**

<212> PRT

<213> Bacillus megaterium

**<400> 2**

Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn  
1 5 10 15

Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile  
20 25 30

Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val  
35 40 45

Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu  
50 55 60

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-7-

Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp  
 65 70 75 80

Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp  
 85 90 95

Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met  
 100 105 110

Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln  
 115 120 125

Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp  
 130 135 140

Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr  
 145 150 155 160

Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser  
 165 170 175

Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn  
 180 185 190

Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp  
 195 200 205

Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys  
 210 215 220

Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly  
 225 230 235 240

Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr  
 245 250 255

Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu  
 260 265 270

Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln  
 275 280 285

Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser  
 290 295 300

Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu  
 305 310 315 320

Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys  
 325 330 335

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



-8-

Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu  
 340 345 350

Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly  
 355 360 365

Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala  
 370 375 380

Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys  
 385 390 395 400

Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met  
 405 410 415

Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp  
 420 425 430

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala  
 435 440 445

Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu  
 450 455 460

Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr  
 465 470 475 480

Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr  
 485 490 495

Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln  
 500 505 510

Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala  
 515 520 525

Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala  
 530 535 540

Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys  
 545 550 555 560

Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr  
 565 570 575

Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys  
 580 585 590

Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp  
 595 600 605

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-9-

Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val  
 610 615 620

Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser  
 625 630 635 640

Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala  
 645 650 655

Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu  
 660 665 670

Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu  
 675 680 685

Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro  
 690 695 700

Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu  
 705 710 715 720

Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu Ala  
 725 730 735

His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr  
 740 745 750

Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala  
 755 760 765

Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu  
 770 775 780

Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met  
 785 790 795 800

Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu  
 805 810 815

Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser  
 820 825 830

Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val  
 835 840 845

Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala  
 850 855 860

Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe  
 865 870 875 880

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-10-

Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr  
885 890 895

Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly  
900 905 910

Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly  
915 920 925

Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu  
930 935 940

Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu  
945                      950                      955                      960

His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln  
965 970 975

His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln  
980 985 990

Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala  
995 1000 1005

Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser  
1010 1015 1020

Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg  
025                      1030                      1035                      1040

Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
1045

**<210> 3**

<211> 30

**<212> DNA**

<213> Synthetic sequence

**<220>**

<223> Description of the synthetic sequence: PCR primer

<400> 3

gcaggagacg ggttgnnnac aagctggacg

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Synthetic sequence

**<220>**

<223> Description of the synthetic sequence: PCR primer

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

WO 01/07630

PCT/EP00/07253

-11-

<400> 4  
cgtccagctt gtnnncaacc cgtctcctgc 30

<210> 5  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Synthetic sequence

<220>  
<223> Description of the synthetic sequence: PCR primer

<400> 5  
gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaatt ccag 34

<210> 6  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Synthetic sequence

<220>  
<223> Description of the synthetic sequence: PCR primer

<400> 6  
ctggatttgc tcgctgnnnc ttgttcattg 30

<210> 7  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Synthetic sequence

<220>  
<223> Description of the synthetic sequence: PCR primer

<400> 7  
gctttgataa aaacttaaag tcaannnctt aaatttgtac g 41

<210> 8  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Synthetic sequence

<220>  
<223> Description of the synthetic sequence: PCR primer

<400> 8  
cgtacaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc 40

<210> 9  
<211> 1049  
<212> PRT  
<213> Bacillus megaterium

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



-12-

&lt;400&gt; 9

Met Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys  
 1 5 10 15

Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys  
 20 25 30

Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg  
 35 40 45

Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp  
 50 55 60

Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn  
 85 90 95

Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala  
 100 105 110

Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val  
 115 120 125

Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu  
 130 135 140

Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn  
 145 150 155 160

Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr  
 165 170 175

Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala  
 180 185 190

Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu  
 195 200 205

Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg  
 210 215 220

Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn  
 225 230 235 240

Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg  
 245 250 255

Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly  
 260 265 270

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-13-

Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu  
 275 280 285

Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro  
 290 295 300

Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn  
 305 310 315 320

Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala  
 325 330 335

Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp  
 340 345 350

Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp  
 355 360 365

Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser  
 370 375 380

Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala  
 385 390 395 400

Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly  
 405 410 415

Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu  
 420 425 430

Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys  
 435 440 445

Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr  
 450 455 460

Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn  
 465 470 475 480

Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly  
 485 490 495

Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro  
 500 505 510

Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly  
 515 520 525

Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn  
 530 535 540

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

-14-

Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val  
 545 550 555 560  
 Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala  
 565 570 575  
 Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala  
 580 585 590  
 Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp  
 595 600 605  
 Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp  
 610 615 620  
 Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys  
 625 630 635 640  
 Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu  
 645 650 655  
 Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu  
 660 665 670  
 Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu  
 675 680 685  
 Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile  
 690 695 700  
 Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly  
 705 710 715 720  
 Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu  
 725 730 735  
 Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln  
 740 745 750  
 Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met  
 755 760 765  
 Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu  
 770 775 780  
 Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr  
 785 790 795 800  
 Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser  
 805 810 815

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

15

Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile  
                   820                                  825                                  830

Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser  
                   835                                  840                                  845

Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile  
                   850                                  855                                  860

Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys  
 865                                  870                                  875                                  880

Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu  
                                   885                                  890                                  895

Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg  
                                   900                                  905                                  910

Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu  
                   915                                  920                                  925

Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr  
                   930                                  935                                  940

Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr  
 945                                  950                                  955                                  960

Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val  
                                   965                                  970                                  975

Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp  
                                   980                                  985                                  990

Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro  
                   995                                  1000                                  1005

Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val  
 1010                                  1015                                  1020

Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly  
 1025                                  1030                                  1035                                  1040

Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly  
                                   1045

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



M/ 40241-US

= DE 195 07 546 = WO 96/27678

96-425437/42 D16 E17 DELB- 95.03.03  
 DELBRUECK CENT MOLEKULARE MEDIZIN MAX \*WO 9627678-A1  
 95.03.03 95DE-1007546 (96.09.12) C12P 7/02, 1/00, 15/81  
**Yeast vector expressing cytochrome P450 and NADPH-dependent reductase - useful for hydroxylation of long chain alkane(s) and fatty acids (Ger)**

C96-134115 N(JP US) R(AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT  
 LU MC NL PT SE)  
 Addnl. Data: ZIMMER T, KAMINSKI K, SCHUNCK W, KAERGEL E,  
 SCHELLER U, MAUERSBERGER S  
 96.03.01 96WO-DE00410

Hydroxylation of long chain alkanes, fatty acids and other alkyl cpds. comprises treatment with a monooxygenase system comprising cytochrome P450 (I) and NADPH-cytochrome P450-reductase (II).

Also new is a vector for genetic modification of *Saccharomyces* based on the YEp51 vector and contg.:

- DNA for (II) between Sall and BamHI restriction sites; and
- a second expression cassette (at a NruI site) contg. the GAL10 promoter, (I)-encoding sequence and the ADH7 terminator.

D(5-H12E) E(10-C2D2, 10-C4D4, 10-C4D5, 11-M)

(28)

**USE**

The method is esp. used to oxidise fatty acids, producing partic. hydroxy-fatty acids and long chain dicarboxylic acids.

**ADVANTAGE**

Oxidn. of the substrate is regioselective (hydroxylation at (sub) terminal C, with further oxidn. if the process is continued) and provides good yields in a simple procedure. Hydroxylation is much (e.g. 20 times) quicker than in systems contg. (I) only.

**PREFERRED METHOD**

(I) are of the CYP52 family and (II) is the *Candida maltosa* enzyme. The two components are esp. simultaneously expressed by *S. cerevisiae* transformed with the new vector. Partic. both genes are controlled by the same promoter, resulting in a 1:3 ratio of (I):(II) which provides the best yield of hydroxylated prod..

The substrate is reacted in a yeast cell homogenate (essential for alkanes) or cell suspension, and pref. is supplied as a soln. in organic (partic. alcoholic) soln. Reaction is at 30-40°C and is generally

WO 9627678-A+

complete in one hour.

**PREPARATION**

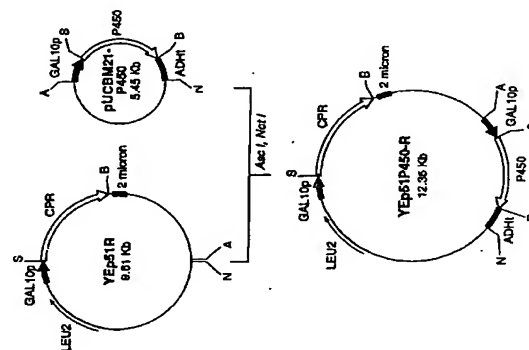
YEp51 having the (II) gene inserted at Sall-BamHI sites was modified by incorporation at the NruI site of a linker that introduces unique Ascl and NotI sites. The vector pUCBM2-P450, contg. the GAL10 promoter (amplified from YEp51), the ADH1 terminator and the cDNA for P450 cm1 or cm2, was digested with Ascl and NotI, and the fragment inserted into the corresponding sites of the modified YEp51 to produce expression vectors, e.g. YEp51 cm2-R, functional in *S. cerevisiae* GRF18.

**EXAMPLE**

An induced culture of *S. cerevisiae* transformed with YEp51 cm2-R was incubated with (per ml) 200 nmole 1-14C-labelled lauric acid. After 15 mins., the cells and supernatant were sepd., extd. and analysed by TLC to indicate (from radioactivity distribution) 35% hydroxylauric acid; 15% dodecanedioic acid (III) and 50% unconverted lauric acid, with 80% of prods. in the supernatant and 83% of residual starting material in the cell pellet.

When reaction was allowed to proceed for 90 mins., complete conversion of lauric acid was achieved with (III) being the main prod.

No conversion was observed when using cells transformed with YEp51 only. (GS3).



(22pp1251DwgNo.1/4)  
 SR:1.Jnl.Ref WO9401564

WO 9627678-A

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**